

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

EFECTOS NEUROPATOLÓGICOS DE LA
INFECCIÓN HEMATÓGENA POR EL
VIRUS *HERPES SIMPLEX* DE TIPO 1 EN UN
MODELO DE ENVEJECIMIENTO EN
RATONES

FERNANDO GUZMÁN SÁNCHEZ

NOVIEMBRE, 2010

Memoria presentada por
FERNANDO GUZMÁN SÁNCHEZ
para aspirar al Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

Directores de esta Tesis:

JAVIER SANTOS BURGOS MUÑOZ

Doctor en Ciencias Biológicas
y

FERNANDO VALDIVIESO AMATE

Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular

Madrid, Noviembre 2010

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), gracias a una beca FPI financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación.



A mis padres

ABREVIATURAS

A β	Péptido β -amiloide
<i>apoE</i>	Gen de la apolipoproteína E murina
apoE	Apolipoproteína E murina
<i>APOE</i>	Gen de la apolipoproteína E humana
ApoE	Apolipoproteína E humana
<i>APOE</i> ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4	Alelos 2, 3 y 4 del gen de la apolipoproteína E
ApoE2, E3 y E4	Isoformas E2, E3 y E4 de la apolipoproteína E
<i>APOJ</i>	Gen de la apolipoproteína J
ApoJ	Apolipoproteína J
<i>APP</i>	Gen de la proteína precursora del péptido β -amiloide
APP	Proteína precursora del péptido β -amiloide
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CMV	Citomegalovirus
Cre	Creatina
DAPI	Dihidrocloreuro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
dpi	Días post-infección
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
gB	Glicoproteína B del HSV-1
gC	Glicoproteína C del HSV-1
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
gI	Glicoproteína I del HSV-1
H&E	Hematoxilina y Eosina
HHV-6	Virus <i>Herpes</i> humano 6
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HO-1	Enzima hemo-oxigenasa 1
HSV-1	Virus <i>Herpes Simplex</i> de tipo 1
HSV-2	Virus <i>Herpes Simplex</i> de tipo 2
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
INF- α , - β y - γ	Interferón alfa, beta y gamma
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
ip	Intraperitoneal

<i>LAT</i>	Gen del transcrito asociado a latencia
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
mpi	Meses post-infección
NAA	N-acetil aspartato
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween-20 al 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PKR</i>	Gen que codifica para PKR
PKR	Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena
<i>PSEN1</i>	Gen de la Presenilina 1
<i>PSEN2</i>	Gen de la Presenilina 2
RMI	Resonancia magnética de imagen
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROI	Región de interés
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Sulfato sódico de dodecilo
SEM	Desviación estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Enzima superóxido dismutasa humana
<i>sod2</i>	Gen de la enzima superóxido dismutasa 2 murina
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos humano
<i>TAP2</i>	Gen de TAP2
tap	Transportador asociado al procesamiento de antígenos murino
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
ufp	Unidad formadora de placa
URL	Unidades relativas de luz

ÍNDICE

ÍNDICE.

1. SUMMARY.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	7
2.1.1. Factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer.....	8
2.1.2. El envejecimiento y el daño oxidativo como eventos claves en la enfermedad de Alzheimer.....	9
2.1.3. La inflamación y la neuroinflamación como posibles mecanismos implicados en la enfermedad de Alzheimer.....	11
2.2. LA HIPÓTESIS PATOGENICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ASOCIACIÓN DEL VIRUS <i>HERPES SIMPLEX</i> DE TIPO 1 CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	12
2.3. EL HSV-1.....	14
2.3.1. Características generales.....	14
2.3.2. La infección por HSV-1.....	15
2.3.3. La latencia.....	16
2.3.4. La reactivación.....	17
2.3.5. Interacción del HSV-1 con el sistema inmune.....	18
2.4. HSV-1 Y FACTORES DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA.....	20
2.4.1. HSV-1 y factores genéticos.....	20
2.4.2. HSV-1 y daño oxidativo.....	21
2.4.3. HSV-1, inflamación y neuroinflamción.....	21
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1. MATERIALES.....	31
4.1.1. Virus.....	31
4.1.2. Animales.....	31
4.1.3. Anticuerpos.....	32

4.1.4. Sondas fluorescentes usadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
4.1.4.1. <i>SYBR Green I</i> ®	32
4.1.4.2. Sondas <i>TaqMan</i> ®-MGB	33
4.1.5. Reactivos de histología	33
4.1.5.1. Dihidrocloruro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	33
4.1.5.2. Hematoxilina de Mayer	33
4.1.5.3. Eosina Y	33
4.1.6. Reactivos generales	34
4.2. MÉTODOS	34
4.2.1. Manipulación de virus	34
4.2.2. Manipulación de los ratones	35
4.2.2.1. Mantenimiento y expansión de las colonias de ratones transgénicos	35
4.2.2.1.1. Extracción del DNA genómico	36
4.2.2.1.2. Análisis del genotipo	36
4.2.2.2. Inoculación, marcaje y seguimiento	37
4.2.2.3. Modelos de infección	37
4.2.2.4. Sangrado	38
4.2.2.5. Sacrificio, disección y tratamiento de las muestras para extracción de DNA y de proteínas	38
4.2.2.6. Perfusión, disección y tratamiento de las muestras para estudios histológicos	40
4.2.3. Cuantificación del DNA mediante PCR cuantitativa	41
4.2.3.1. PCR cuantitativa con <i>SYBR Green I</i> ®	41
4.2.3.2. PCR cuantitativa con sondas <i>TaqMan</i> ®-MGB	42
4.2.4. Histología e inmunohistoquímica	43
4.2.5. Cuantificación de la carga de HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante imagen por bioluminiscencia	45
4.2.6. Cuantificación de la carga de HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante medida de la cantidad de luz <i>in vitro</i>	46

4.2.7. Estudios de resonancia magnética de imagen y de espectroscopía.....	46
4.2.8. Test de memoria: reconocimiento de objetos.....	48
4.2.9. Análisis estadístico.....	50
5. RESULTADOS.....	55
5.1. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN HEMATÓGENA PRODUCIDA POR EL VIRUS HSV-1 KOS/Dlux/oriL EN RATONES CD-1.....	55
5.1.1. Seguimiento mediante bioluminiscencia <i>in vivo</i>	55
5.1.2. Seguimiento mediante PCR cuantitativa.....	59
5.1.3. Seguimiento mediante luminiscencia <i>in vitro</i>	63
5.2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN HEMATÓGENA DEL HSV-1 KOS Y DEL HSV-1 KOS/Dlux/oriL EN DIFERENTES CEPAS DE RATONES.....	64
5.2.1. Eficiencia de la infección por HSV-1 KOS en diferentes cepas de ratones.....	64
5.2.2. Estudio comparativo de la infección hematógena de los virus HSV-1 KOS y HSV-1 kos/Dlux/oriL en diferentes cepas de ratones.....	66
5.2.3. Efecto de la dosis de inoculación de HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos durante la fase aguda de la infección.....	70
5.2.4. Cinética de la infección aguda del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos.....	71
5.2.5. Efecto de la dosis de inoculación de HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos durante la fase latente de la infección.....	73
5.3. ESTUDIO DE LA NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR HSV-1.....	74
5.3.1. Determinación de la carga viral del HSV-1 con la edad	74
5.3.2. Determinación de la carga viral en ratones infectados con HSV-1 y envejecidos de 18 meses de edad	77
5.3.2.1. Efecto del género.....	77
5.3.2.2. Efecto de la dosis de inoculación.....	79
5.3.2.3. Influencia del gen <i>apoE</i>	81
5.3.3. Determinación de la carga viral en ratones <i>sod2 +/-</i>	87
5.3.3.1. Infección aguda.....	87

5.3.3.2. Infección y envejecimiento.....	90
5.3.4. Estudios patológicos en el encéfalo de ratones infectados con HSV-1.....	92
5.3.4.1. Estudios en ratones salvajes y en ratones <i>sod2</i> ^{+/-} durante las infecciones aguda y latente.....	93
5.3.4.1.1. Detección de proteínas virales.....	93
5.3.4.1.2. Estudio de la neuroinflamación.....	97
5.3.4.1.3. Detección de daño oxidativo.....	101
5.3.4.1.4. Detección de astrogliosis.....	105
5.3.4.2. Estudios en ratones salvajes y en ratones <i>sod2</i> ^{+/-} infectados con HSV-1 y envejecidos de 18 meses de edad.....	113
5.3.4.2.1. Detección de proteínas virales.....	113
5.3.4.2.2. Estudio de la neuroinflamación.....	115
5.3.4.2.3. Detección de daño oxidativo.....	119
5.3.4.2.4. Detección de astrogliosis.....	122
5.3.5. Estudios <i>in vivo</i> del encéfalo de ratones infectados con HSV-1 mediante resonancia magnética de imagen y espectroscopía.....	130
5.3.6. Estudio del deterioro cognitivo asociado a la infección por HSV-1.....	134
6.DISCUSIÓN.....	139
6.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	139
6.2. FACTORES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	139
6.3. HIPÓTESIS PATOGENICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: IMPLICACIÓN DEL VIRUS <i>HERPES SIMPLEX</i> DE TIPO 1	140
6.4. FACTORES COMÚNMENTE IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EN LA INFECCIÓN POR HSV-1.....	141
6.4.1. El envejecimiento.....	141
6.4.2. El daño oxidativo.....	142
6.4.3. El sistema inmune.....	143
6.4.4. El <i>APOE</i> ϵ 4.....	144
6.4.5. El género.....	145

6.4.6. El número de genomas virales en el sistema nervioso: ¿un hecho relevante en la enfermedad de Alzheimer?	145
6.5. EFECTO NEUROPATOLÓGICO DEL HSV-1.....	147
6.5.1. La neuroinvasión del HSV-1 en el modelo de infección hematógica.....	147
6.5.2. Efectos neuropatológicos de la infección.....	148
6.5.3. Estudios <i>in vivo</i> de infección y de neurodegeneración.....	149
6.5.4. Fenotipado conductual.....	150
7.CONCLUSIONES.....	155
8. BIBLIOGRAFÍA.....	161
8.ANEXO:Publicaciones.....	189

SUMMARY

1. SUMMARY.

To date, the causes of Alzheimer's disease (AD) have been not identified and there is still no consensus of opinion regarding the etiology of its sporadic form. Several genetic factors are known to be important, although they have been identified that account for a small number of cases of familial, early-onset AD. The majority of cases of AD, however, are sporadic and appear not to be associated with any known set of genetic markers. At present, only two factors are widely accepted as being related with the non-familial disease: the aging, and the possession of the apolipoproteinE 4 allele (*APOE ε4*). Additionally, women present a higher prevalence for the disease than men. This suggests that the disease has a multifactorial etiology, where the large majority of AD cases develop from an interaction of genetic and non-genetic factors. In the last years, the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been related with the sporadic AD, and although a close correlation among *apoE* dosage, *APOE ε4* genotype and female gender with neuroinfection has been demonstrated, no aging studies have been evaluated to date.

In the present work, it has been analyzed if the main risk factors related to AD (such as aging, oxidative damage, *apoE* presence, immunosuppression or female gender) are also correlated to the viral loads in the central nervous system (CNS) of mice hematogenously infected with HSV-1. Secondly, the neuropathological consequences of the brain infection with aging were studied, by means the use of classical and non-invasive methodologies. The results obtained indicate that: (i) aging modulates the viral loads in CNS, (ii) immune system influences the HSV-1 brain infection, (iii) *apoE* and female gender are correlated to brain virus levels, (iv) oxidative damage affects the brain infection, (v) HSV-1 infection induces neuroinflammation, astrogliosis and oxidative damage in the infected brains, (vi) magnetic resonance imaging and bioluminescence are valid methodologies for the *in vivo* study of HSV-1 infection, and (vii) HSV-1 infection in mice is related to cognitive impairment.

In summarize, the experiments presented here clarify some points regarding the interaction of several risk factors related to AD, particularly regarding to the modulation of cerebral HSV-1 levels with aging, and with the neuropathological consequences of the brain infection. This work demonstrates that cerebral HSV-1 infection depends on the combination of aging, *apoE* profile, and gender in mice. The relationship among these parameters could be of great importance in the pathogenesis of the brain diseases associated to HSV-1 infection and particularly with AD.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia, sumando más del 50% de todos los casos descritos (Querfurth and LaFerla, 2010). Se trata de un proceso neurodegenerativo que se caracteriza por una masiva pérdida de neuronas y por la alteración de los procesos sinápticos, principalmente de las regiones cerebrales encargadas de la función cognitiva como son los lóbulos frontal y temporal de la corteza y el hipocampo (Blennow y cols., 2006; Nussbaum and Ellis, 2003). A nivel clínico, la enfermedad cursa con el deterioro progresivo e irreversible de la memoria y de otras capacidades mentales utilizadas en la vida diaria, que incapacita a los enfermos y que acaba con la muerte (Nussbaum and Ellis, 2003).

El diagnóstico actual de la enfermedad se basa en estudios neurológicos, así como en el análisis de imágenes cerebrales obtenidas por resonancia magnética de imagen (RMI) o por tomografía de emisión de positrones, y por la exclusión de otros tipos de demencia, aunque la confirmación definitiva sólo se consigue mediante el análisis *post-mortem* del cerebro de los afectados (Blennow y cols., 2006). Las marcas histopatológicas de la enfermedad son los depósitos extracelulares del péptido β -amiloide (o $A\beta$), denominados placas amiloides, y los ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau anormalmente hiperfosforilada (Nussbaum and Ellis, 2003).

A pesar de que la EA se describió por primera vez hace más de 100 años, los mecanismos causantes de la mayoría de los casos siguen siendo desconocidos (Blennow y cols., 2006). Tan sólo se sabe que mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora del péptido β -amiloide (*APP*) y para las presenilinas 1 y 2 (*PSEN 1* y *PSEN 2*) son las responsables de la forma genética o familiar de la EA, que resulta ser minoritaria ya que presenta una prevalencia menor del 1%. Esta forma de la enfermedad es de herencia autosómica dominante y de aparición temprana, antes de los 65 años (Blennow y cols., 2006).

Por el contrario, la forma más común denominada EA esporádica es de aparición tardía, se da en personas mayores de 65 años, y es de origen multifactorial (Blennow y cols., 2006). En este caso, el desarrollo de la enfermedad se debe a la combinación de factores genéticos de susceptibilidad y de factores ambientales (Blennow y cols., 2006; Nussbaum and Ellis, 2003), entre los que se encuentran el alelo $\epsilon 4$ del gen que codifica para la apolipoproteína E (*APOE $\epsilon 4$*) (Corder y cols., 1993), la edad avanzada (Lindsay y cols., 2002; Munoz and Feldman, 2000), el género femenino (Andersen y cols., 1999; Farrer y cols., 1997), la neuroinflamación (Holmes y cols., 2009; McGeer and McGeer, 2001), los traumatismos craneoencefálicos (Jellinger, 2004)

y las infecciones, y en particular las producidas por el virus *Herpes Simplex* de tipo 1 (HSV-1) (Dobson y cols., 2003; Honjo y cols., 2009).

Debido a que tanto la enfermedad genética como la esporádica presentan una cierta similitud en las manifestaciones clínicas, en 1991 se propuso la “teoría amiloide” (Selkoe, 1991), siendo ésta utilizada desde entonces como herramienta para el estudio de ambas formas de la EA (Blennow y cols., 2006). Esta teoría propone que la formación y la agregación del péptido A β es el origen de la cascada patogénica observada en la enfermedad, independientemente de que ésta sea de origen familiar o esporádico (Hardy and Allsop, 1991; Hardy and Selkoe, 2002). Consecuentemente, la mayoría de los modelos animales desarrollados para el estudio de la patogénesis de la EA están basados en esta teoría (Blennow y cols., 2006), así como los ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Mandavilli, 2006). Sin embargo, otros autores han propuesto que la acumulación del péptido A β es un acontecimiento secundario en el desarrollo de la EA, e incluso beneficioso (Robinson and Bishop, 2002). Por otra parte, la teoría amiloide no explica la hiperfosforilación anómala de la proteína tau (Kokjohn and Roher, 2009; Mandavilli, 2006), cuyos agregados se correlacionan más estrechamente con el deterioro cognitivo que los agregados del péptido A β (Giannakopoulos y cols., 2003). Además, el fracaso de los ensayos clínicos destinados a la generación de fármacos que modifiquen el desarrollo de la EA y que están basados en la eliminación del A β del cerebro, sugiere que los mecanismos descritos por la teoría amiloide tienen poca relevancia en el desarrollo de la enfermedad o que se trata de procesos colaterales o es una consecuencia en la cascada patogénica (Kokjohn and Roher, 2009; Querfurth and LaFerla, 2010). En este sentido, entre la comunidad científica se ha comenzado una profunda revisión, proponiendo nuevas teorías y nuevas líneas de investigación en el estudio de las causas de la EA (Mandavilli, 2006).

2.1.1. Factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Hasta la fecha, el principal factor de riesgo genético asociado a la EA esporádica es el *APOE ϵ 4* (Corder y cols., 1993; Lambert y cols., 2009; Poirier y cols., 1993; Strittmatter and Roses, 1995), aunque la posesión de este alelo no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Farrer y cols., 1997).

La apolipoproteína E (ApoE) es una apolipoproteína implicada en el transporte de lípidos y de colesterol entre diferentes tejidos y células del organismo (Mahley and Rall, 2000). En el sistema nervioso central (SNC), el ApoE regula los niveles de colesterol en las membranas y participa en los procesos de reparación tras situaciones de daño neuronal (Ignatius y cols., 1986; Mahley and Rall, 2000). El gen que codifica para el ApoE posee tres variantes alélicas

mayoritarias en humanos: *APOE* $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que dan lugar a las diferentes isoformas de la proteína denominadas ApoE2, -E3 y -E4 (Strittmatter and Roses, 1995).

La posesión de un alelo *APOE* $\epsilon 4$ incrementa el riesgo de padecer la enfermedad tres veces y la posesión de dos alelos hasta ocho veces (Corder y cols., 1993). Además, el *APOE* $\epsilon 4$ disminuye la edad de aparición de los síntomas de una forma dependiente de dosis, con cada copia reduciendo la edad de comienzo aproximadamente en diez años (Corder y cols., 1993), aunque el modo en el que contribuye al desarrollo de la enfermedad está aún por determinar (Mahley y cols., 2006). Además, en nuestro laboratorio se comprobó que un polimorfismo en la región promotora del *APOE* también incrementaba el riesgo de padecer la EA (Artiga y cols., 1998; Bullido y cols., 1998). Experimentalmente, se ha descrito que ratones humanizados para el *APOE* $\epsilon 4$ presentan daños cognitivos dependientes del género y de la edad (Raber y cols., 1998). Asimismo, diferentes trabajos han demostrado que el ApoE4 es menos efectivo en los procesos de mantenimiento y reparación neuronales que la isoforma E3, por lo que ante procesos neurodegenerativos asociados al envejecimiento o al estrés, la posesión del ApoE4 contribuye a la patología asociada (Mahley and Huang, 1999). Además, se ha observado que el ApoE4 incrementa la inflamación inducida por lipopolisacáridos bacterianos en modelos murinos de inflamación (Lynch y cols., 2003). Por otra parte, en relación con las marcas histopatológicas de la EA, se ha descrito que el ApoE4 induce la producción y la acumulación del péptido A β y la hiperfosforilación anómala de la proteína del citoesqueleto tau (Tesseur y cols., 2000; Ye y cols., 2005).

Recientemente se ha determinado la asociación del gen de esta misma familia que codifica para la apolipoproteína J (*APOJ*) con un incremento en el riesgo de padecer la EA, aunque con menor fuerza estadística que la presentada por el *APOE* $\epsilon 4$ (Lambert y cols., 2009). La ApoJ, junto con el ApoE, son las apolipoproteínas más abundantemente expresadas en el SNC y ambas comparten analogías en relación con su posible implicación en la patología de la EA (Lambert y cols., 2009; May and Finch, 1992).

2.1.2. El envejecimiento y el daño oxidativo como eventos claves en la enfermedad de Alzheimer.

El envejecimiento es el principal factor de riesgo no genético asociado a la EA (Blennow y cols., 2006; Lindsay y cols., 2002). De hecho, la prevalencia de la EA aumenta con la edad afectando al 1% de la población de 65 años, al 33% de personas mayores de 85 años y alcanza entre el 40 y el 50% de los mayores de 95 años (Blennow y cols., 2006; Nussbaum and Ellis, 2003). Además, en la edad avanzada se incrementa el estrés oxidativo en el cerebro (Floyd and

Hensley, 2002), lo que produce la acción continuada de los radicales libres sobre las neuronas, contribuyendo al desarrollo de la EA y de otras enfermedades neurodegenerativas (Andersen, 2004; Harman, 1981).

Durante el metabolismo normal de la célula se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) que son capaces de oxidar al DNA, a los lípidos, a las proteínas y a los glúcidos (Su y cols., 2008). No obstante, las células poseen sistemas antioxidantes para evitar la acción perjudicial de dichas especies reactivas, entre los que se encuentran enzimas como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD), y otras moléculas como la vitamina E, el glutatión y el ácido ascórbico que eliminan los radicales libres generados (Su y cols., 2008). Así pues, el estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción y la acción de los radicales libres, y los mecanismos celulares implicados en la eliminación de dichos radicales libres (Sayre y cols., 2008).

El cerebro presenta una serie de características que lo hacen especialmente susceptible al daño por radicales libres: posee altas concentraciones de lípidos insaturados que son fácilmente oxidables; requiere mucha energía para su correcto funcionamiento por lo que consume mucho oxígeno, generando ROS como subproductos; presenta un alto contenido en metales de transición que catalizan las reacciones de generación de radicales libres; y posee una escasa cantidad de enzimas antioxidantes comparado con otros tejidos (Coyle and Puttfarcken, 1993; Floyd and Hensley, 2002; Markesbery, 1997).

En los cerebros de enfermos de alzhéimer, junto a las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, se han detectado marcadores de daño oxidativo en los lípidos como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Markesbery and Lovell, 1998) o los isoprostanos (Pratico y cols., 1998), productos del daño en el DNA y en el RNA como el 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Nunomura y cols., 2001) o el 8-hidroxiguanosina (Nunomura y cols., 1999), productos del daño en las proteínas (Smith y cols., 1996) y productos del daño en los glúcidos (Smith y cols., 1995) indicando la asociación del daño oxidativo con la EA. Además, junto a estos productos se han observado cantidades elevadas de los principales sistemas antioxidantes, como la enzima SOD (Marcus y cols., 2006) o la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (Premkumar y cols., 1995), revelando una respuesta celular insuficiente al estrés oxidativo (Moreira y cols., 2008).

Sin embargo, diferentes estudios han determinado que el daño oxidativo no es sólo una consecuencia de la patología de la EA, sino que posee un papel iniciador en el desarrollo de la enfermedad (Nunomura y cols., 2006; Su y cols., 2008; Zhu y cols., 2005). Se ha observado que la aparición de los marcadores del daño oxidativo en el DNA en las neuronas precede a la aparición de las marcas histopatológicas de la enfermedad (Nunomura y cols., 2001). Además,

se han encontrado niveles elevados de isoprostanos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve indicando que la peroxidación de los lípidos es un proceso anterior al desarrollo de la EA (Markesbery y cols., 2005).

2.1.3. La inflamación y la neuroinflamación como posibles mecanismos implicados en la enfermedad de Alzheimer.

La asociación de la neuroinflamación con la EA se basa en el hallazgo de citoquinas, de microglía y de astrocitos activados junto a las placas seniles y a los ovillos neurofibrilares en los cerebros de enfermos de alzhéimer (Akiyama y cols., 2000; McGeer and McGeer, 2001). Además, a nivel mecanístico se ha observado que el péptido A β y que la proteína tau hiperfosforilada son capaces de inducir la producción, por parte de la microglía, de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas-1 β (IL-1 β) y -6 (IL-6). Estas moléculas, a su vez, estimulan la formación del péptido A β y la hiperfosforilación de tau (Kamer y cols., 2008; Mrak and Griffin, 2005) indicando un reforzamiento cíclico de las señales que conducen al desarrollo de la neurodegeneración en la EA.

Por otra parte, la presencia de niveles elevados de moléculas inflamatorias en la sangre de enfermos de alzhéimer, como la proteína C reactiva (Strandberg and Tilvis, 2000) o la IL-6 (Kalman y cols., 1997), refuerzan la importancia de la inflamación en la EA (Engelhart y cols., 2004), y señalan la relación entre las infecciones sistémicas y la neurodegeneración, puesto que existe una comunicación de las señales proinflamatorias sistémicas con el cerebro (Perry y cols., 2007). En este sentido, Holmes y col., observaron un déficit más acusado en la función cognitiva en enfermos de alzhéimer que habían padecido una infección sistémica, y que estaba precedido por un incremento de los niveles de IL-1 β en sangre (Holmes y cols., 2003). Otro de los argumentos a favor de la implicación de la inflamación en la patogénesis de la EA, proviene de los estudios clínicos que asocian el consumo de medicamentos antiinflamatorios con la disminución del riesgo de padecer la EA (in t' Veld y cols., 2001; McGeer y cols., 1996; Vlad y cols., 2008).

En resumen, durante el proceso normal de envejecimiento se activa la microglía y se liberan citoquinas en el cerebro (Mrak and Griffin, 2005), pero ante determinados episodios de inflamación localizados en el cerebro o incluso sistémicos originados por diferentes causas como las infecciones, se produce una nueva señalización inflamatoria que refuerza la existente en el cerebro y que propicia la liberación de radicales libres, la aparición de daño oxidativo y el desarrollo acelerado de las patologías existentes (Frank-Cannon y cols., 2009; Holmes y cols., 2009).

2.2. LA HIPÓTESIS PATOGENICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ASOCIACIÓN DEL VIRUS *HERPES SIMPLEX* DE TIPO 1 CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La naturaleza crónica y esporádica de la mayoría de los casos de la EA en la que los afectados son personas de edad avanzada, sugiere que la exposición prolongada a factores ambientales, además de la posesión de determinados factores genéticos de susceptibilidad, está asociada a la etiología de la enfermedad (Pyles, 2001). Entre los factores ambientales propuestos, los agentes infecciosos se muestran como candidatos potenciales a participar en el desarrollo de la EA, y en particular el HSV-1, aunque otros virus como el virus *Herpes* humano 6 (HHV-6), el virus *Herpes Simplex* de tipo 2 (HSV-2) y el Citomegalovirus (CMV) (Lin y cols., 2002), y bacterias como *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y diferentes espiroquetas (Balin y cols., 1998; Kountouras y cols., 2006) se han relacionado también con la EA (Dobson y cols., 2003; Honjo y cols., 2009), pero de forma menos consistente que el HSV-1.

El HSV-1 es ubicuo en la población adulta, donde más del 90% de las personas poseen anticuerpos contra el virus, lo que concuerda con la alta prevalencia de la EA (Blennow y cols., 2006; Fratiglioni y cols., 1999). Además, el carácter neurotrópico del virus y su capacidad para permanecer en estado de latencia a lo largo de la vida del hospedador, y de reactivarse como consecuencia de la acción de diferentes estímulos (Roizman, 2007), favorecen la posible implicación del HSV-1 en la etiología de la enfermedad.

La primera de las evidencias epidemiológicas que asociaron al HSV-1 con la EA fue el descubrimiento de que las principales zonas infectadas durante la encefalitis herpética (la corteza frontal, la corteza temporal y el hipocampo), son las regiones más dañadas en la EA (Ball, 1982). Años después, se comprobó que tanto los cerebros de los enfermos de alzhéimer como los cerebros de personas control presentaban DNA de HSV-1, principalmente en la corteza frontal y temporal (Itabashi y cols., 1997; Jamieson y cols., 1992). En esta línea, la evidencia más sólida que asocia al HSV-1 con la EA proviene de estudios epidemiológicos en cerebros de enfermos de alzhéimer y en cerebros de personas control, en los que se observa un incremento significativo del riesgo de padecer la EA esporádica en portadores del *APOE* $\epsilon 4$ y que, además, poseen virus en el cerebro (Itzhaki y cols., 1997). Ni el *APOE* $\epsilon 4$, ni el HSV-1 por sí mismos son necesarios ni suficientes para padecer la EA, sin embargo, la asociación de ambos incrementa notablemente el riesgo de sufrir la enfermedad (Itzhaki, 2004).

Por otra parte, el HSV-1 se ha relacionado con las marcas histopatológicas características de la EA. En primer lugar, se ha demostrado que la glicoproteína B (gB) del HSV-1 presenta homología de secuencia con el péptido A β (Cribbs y cols., 2000), por lo que dicha glicoproteína

puede actuar como agente iniciador de la deposición del péptido A β en la formación de las placas amiloides. Además, recientemente se ha descubierto DNA de HSV-1 en las placas amiloides de los cerebros de enfermos de alzhéimer, reforzando la asociación del virus con la enfermedad y asignándole un papel iniciador en la formación de las placas (Kammerman y cols., 2006; Wozniak y cols., 2009b). Por otra parte, estudios de infección con HSV-1 han demostrado la acumulación intracelular del péptido A β inducida por el virus en células en cultivo y en el cerebro de ratones infectados, así como la hiperfosforilación de la proteína tau en cultivos celulares (Wozniak y cols., 2009a; Wozniak y cols., 2007). Además, durante el transporte del virus a través de los axones, el HSV-1 se asocia con el APP causando posiblemente un procesamiento anormal de la proteína que promueve la generación del péptido A β (Satpute-Krishnan y cols., 2003).

En la tabla I.1. se muestra un resumen de los principales hallazgos epidemiológicos y experimentales que refuerzan la asociación del HSV-1 con la EA.

Hallazgos asociación HSV-1 y EA	
Epidemiológicos	
Evidencia	Referencia
Correlación de las regiones cerebrales dañadas en la encefalitis herpética con las regiones afectadas en la EA	(Ball, 1982)
Detección de DNA de HSV-1 en el cerebro de enfermos de alzhéimer y de controles	(Jamieson y cols., 1992)
Aumento del riesgo de padecer EA en personas portadoras de <i>APOE</i> $\epsilon 4$ y HSV-1 en el cerebro	(Itzhaki y cols., 1997)
Detección de DNA y de antígenos de HSV-1 en cerebros de pacientes de EA familiar y esporádica	(Mori y cols., 2004)
Detección de anticuerpos contra el HSV-1 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de EA y de controles	(Wozniak y cols., 2005)
Detección de HSV-1 en placas amiloides de cerebros de enfermos de alzhéimer y de controles	(Wozniak y cols., 2009b)

Experimentales	
Evidencia	Referencia
Homología de secuencia entre la gB del HSV-1 y el péptido A β	(Cribbs y cols., 2000)
Asociación del HSV-1 con el APP durante el transporte anterógrado por el axon	(Satpute-Krishnan y cols., 2003)
Acumulación intracelular del péptido A β en células en cultivo infectadas con HSV-1	(Wozniak y cols., 2007)
Formación de depósitos del péptido A β en cerebros de ratones infectados con HSV-1	(Wozniak y cols., 2007)
Hiperfosforilación de tau en células en cultivo infectadas con HSV1	(Wozniak y cols., 2009a)

Tabla I.1. Principales hallazgos epidemiológicos y experimentales de la asociación entre el HSV-1 y la EA.

2.3. El HSV-1.

2.3.1. Características generales.

El HSV-1 es un virus de la familia de los *herpesviridae*, subfamilia *alphaherpesvirinae* y género *simplexvirus* (Davison, 2008), que se caracteriza por presentar un ciclo reproductivo relativamente rápido, por replicarse eficientemente en células en cultivo, por lisar las células infectadas y por tener la capacidad de establecer latencia en tejidos del sistema nervioso (Davison, 2008; Wagner y cols., 1995). La estructura de los viriones está formada por un núcleo electrodenso donde se encuentra el DNA de doble cadena, una masa amorfa denominada tegumento, una cápsida icosaédrica y una envuelta viral donde se encuentran adsorbidas glicoproteínas (Roizman, 2007). El genoma del HSV-1 codifica 84 genes (Roizman, 2007), los cuales se clasifican en al menos 3 grupos atendiendo al patrón de expresión temporal: genes α (inmediatamente tempranos) que regulan la replicación viral, genes β (tempranos) que regulan la síntesis del DNA, y genes γ (tardíos) que dan lugar a proteínas estructurales del virión (Honess and Roizman, 1974; Whitley and Roizman, 2001).

El HSV-1 es un virus prácticamente ubicuo en los seres humanos (Roizman, 2007). La prevalencia del HSV-1 en la población depende de factores sociales, económicos, geográficos y de edad, aunque en todos los casos la seroprevalencia del HSV-1 es elevada en personas de

edad avanzada (Roizman, 2007). La infección primaria generalmente ocurre en niños menores de 5 años, donde el 20% de la población presenta anticuerpos frente al HSV-1. El porcentaje de personas seropositivas para el HSV-1 aumenta con la edad alcanzando al 40-60% de los adolescentes y llegando, según diversos estudios, al 90% de la población adulta (Isacsohn y cols., 2002; Smith and Robinson, 2002; Xu y cols., 2002).

La infección por HSV-1 es asintomática (subclínica o silenciosa) en la mayoría de las ocasiones, sin embargo, en otras causa diversas patologías que varían en la frecuencia en la que se producen y en la gravedad de los daños que originan (Whitley and Roizman, 2001). La enfermedad más común asociada al HSV-1 es el herpes labial que consiste en la aparición de pequeñas vesículas en la boca (Whitley and Roizman, 2001). Entre el 20 y el 40% de la población sufre esta patología debida a procesos de reactivación viral con una frecuencia variable en el tiempo (Johnson, 1998; Whitley and Roizman, 2001). En otras ocasiones la infección primaria produce gingivostomatitis, eccemas herpéticos, heridas genitales, conjuntivitis herpética e incluso ceguera (Roizman, 2007; Whitley and Roizman, 2001). Además, el HSV-1 es la principal causa de encefalitis severa en humanos (Meyer y cols., 1960).

2.3.2. La infección por HSV-1.

La primoinfección por el HSV-1 en humanos se inicia, de forma general, a través del contacto directo de las mucosas de la boca o de heridas en los labios de una persona susceptible a la infección, con el HSV-1 presente en la saliva o en la sangre de una persona infectada (Roizman, 2007). A partir de este momento, el virus se replica en el epitelio de la boca y alcanza las terminaciones nerviosas que lo inervan, desde donde es transportado de manera retrógrada hasta el ganglio trigémino, donde puede establecer latencia y/o continuar su proceso de infección hasta invadir el SNC (Roizman, 2007). Otras vías de entrada del virus en humanos son a través de las mucosas de los ojos o de la nariz que, como en el caso anterior, suponen la invasión del ganglio trigémino o a través de la mucosa genital invadiendo los ganglios de la raíz dorsal y, posteriormente, la médula espinal y el SNC (Roizman, 2007). En todos los casos anteriores se establece una ruta neural de invasión del sistema nervioso.

Sin embargo, en personas inmunodeprimidas y en neonatos la ruta hematógena es la principal vía de infección por HSV-1 (Arvin y cols., 1982; Johnson, 1964). Estudios de infección en ratones han demostrado que las infecciones intraperitoneal (ip) (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002) e intravenosa (Burgos y cols., 2006c) mimetizan la vía hematógena. En dichos experimentos se ha observado que el virus viaja por el torrente sanguíneo colonizando órganos periféricos, como la glándula adrenal (Burgos y cols., 2002; Potratz y cols., 1986) y el ovario

(Burgos y cols., 2005; Wiegand y cols., 1991), replicándose eficientemente e invadiendo las terminaciones nerviosas que inervan dichos tejidos para, posteriormente, seguir la ruta neural e invadir la médula espinal (Hill y cols., 1986b) y llegar por transporte retrógrado al encéfalo (Burgos y cols., 2002; Johnson, 1964).

Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito, mediante un modelo de infección en ratones, la transmisión vertical del HSV-1 por vía hematógena de la madre a la sangre y al SNC de la descendencia (Burgos y cols., 2006a), así como el aumento de la carga viral en el encéfalo con la edad (Burgos y cols., 2006a). Este tipo de infección es compatible con la aparición de la infección sistémica en neonatos en humanos (Burgos y cols., 2006a).

2.3.3. La latencia.

La latencia se define como la fase de la infección en la cual el genoma viral se encuentra en el núcleo de la célula infectada en estado no replicativo y que se alcanza a partir de los 28 días post-infección (dpi) (Miller y cols., 1998; Roizman and Sears, 1987; Roizman, 1996).

El HSV-1 establece latencia en los ganglios neuronales tras el proceso de infección lítica (Miller y cols., 1998), adquiriendo una conformación circular y permaneciendo en forma episomal en el núcleo de la neurona (Decman y cols., 2005; Roizman, 2007; Whitley and Roizman, 2001). Durante la fase de latencia, la transcripción de los genes responsables de la replicación viral está bloqueada mientras que sólo se transcribe el producto de aproximadamente 8.3 kb del gen que codifica para el transcrito asociado a la latencia (*LAT*) (Farrell y cols., 1991). Este transcrito, y los derivados de su procesamiento posterior, son los únicos productos que se detectan de manera constante en las neuronas infectadas latentemente (Stevens y cols., 1987). Sin embargo, diversos estudios en modelos animales de infección reflejan que el gen *LAT* no es imprescindible para la entrada del virus en la fase de latencia, puesto que virus defectivos en dicho gen establecen latencia (Javier y cols., 1988; Steiner y cols., 1989). Por el contrario, estudios recientes han revelado la existencia de una serie de moléculas de RNA de pequeño tamaño (miRNA y sRNA) relacionadas con el gen *LAT*, que podrían estar silenciando al producto de los genes inmediatamente tempranos responsables de la replicación viral (*ICP0* e *ICP4*) y promoviendo, por lo tanto, la latencia además de inhibiendo la apoptosis (Shen y cols., 2009; Umbach y cols., 2008).

El HSV-1 establece latencia en humanos y en ratones principalmente en las neuronas sensoriales y, en especial, en el ganglio trigémino (Baringer and Swoveland, 1973; Lynas y cols., 1989; Stevens and Cook, 1971). Además, se ha detectado la presencia del HSV-1 en los

ganglios sacros (Baringer, 1974), en los ganglios del nervio vago (Gesser y cols., 1994; Warren y cols., 1978), en los ganglios cervicales de la médula espinal (Warren y cols., 1978), en los ganglios de la raíz dorsal (Cook and Stevens, 1976; Hill y cols., 1975) e incluso en varias regiones del encéfalo como son la médula oblonga, el puente, la amígdala y el hipocampo (Baringer and Pisani, 1994; Cook and Stevens, 1976; Sequiera y cols., 1979)

2.3.4. La reactivación.

La reactivación es el proceso mediante el cual los genomas virales presentes en estado de latencia en los ganglios sensoriales inician, tras recibir el estímulo adecuado, un proceso de replicación viral y fabrican nuevos viriones (Miller y cols., 1998; Roizman, 2007). Los viriones generados pueden viajar por las terminaciones nerviosas para infectar, nuevamente, los tejidos epiteliales del sitio de infección primaria como ocurre en las fiebres frías en lo que se conoce como recurrencia, o infectar de forma asintomática a otras neuronas o, incluso, alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse por el organismo (Miller y cols., 1998; Roizman, 2007).

Se han descrito reactivaciones espontáneas del HSV-1 tanto en humanos como en modelos animales de infección (Feldman y cols., 2002; Hill y cols., 1987; Johnson, 1998). La reactivación viral en humanos está causada por fenómenos de estrés, de inmunosupresión, de hipertermia, por traumas, por exposición a rayos ultravioleta y por cambios hormonales, por lo que estos mismos estímulos se han empleado para la inducción de la reactivación en modelos animales (en ratón, en conejo y en cobaya) (Beyer y cols., 1990; Hill y cols., 1987; Sawtell and Thompson, 1992; Stanberry, 1989). No obstante, los estudios realizados en ratones muestran la resistencia de este animal al proceso de reactivación (Hill y cols., 1987) y los experimentos realizados en este modelo estarían casi exclusivamente restringidos a protocolos de agresión a explantes de células de ganglio trigémino en cultivo (Sawtell and Thompson, 1992), aunque en nuestro laboratorio se ha conseguido reactivar al HSV-1 en cultivos primarios de hipocampo (Burgos y cols., 2006a).

Los mecanismos moleculares que controlan la reactivación viral son aún desconocidos. Sin embargo, se admite que los factores implicados en el proceso de replicación viral juegan un papel importante en el fenómeno de la reactivación (Miller y cols., 1998), ya que virus defectivos en genes implicados en la replicación son capaces de establecer latencia, pero no pueden reactivarse (Katz y cols., 1990; Sedarati y cols., 1993). El transcrito *LAT* también ha sido relacionado con este fenómeno debido a que virus deficientes para *LAT* ven reducida su capacidad de reactivación (Leib y cols., 1989; Perng y cols., 1994). En cuanto a los factores celulares implicados en el control de la reactivación, el sistema inmune del hospedador muestra

un papel relevante ya que los individuos inmunosuprimidos presentan reactivaciones virales de manera frecuente (Pereira y cols., 2003). Entre los estímulos descritos que inducen la reactivación se encuentran aquellos que alteran la respuesta inmune como son el estrés, la ciclofosfamida y la epinefrina (Hill y cols., 1986a; Sainz y cols., 2001; Tanaka y cols., 1994). Además, diversos autores han demostrado la existencia continuada de linfocitos T, y en especial de CD8⁺, en el ganglio trigémino de humanos y de ratones infectados latentemente con HSV-1 y proponen que están desempeñando un papel en el control de la latencia y de la reactivación (Decman y cols., 2005; Theil y cols., 2003). Por otra parte, se ha sugerido una correlación entre el número de genomas virales presentes de forma individual en una neurona y la probabilidad de que sufra un proceso de reactivación (Sawtell y cols., 1998). Se admite que debe de haber un número mínimo de copias virales en latencia en una neurona para que tras recibir el estímulo adecuado, se superen los factores que inhiben la replicación y se produzca la reactivación (Chen y cols., 2006; Roizman and Sears, 1987; Sawtell y cols., 1998)

2.3.5. Interacción del HSV-1 con el sistema inmune.

Ante una infección por HSV-1, los organismos presentan una respuesta inmune innata que consiste principalmente en la producción de agentes inflamatorios como las citoquinas por parte de los macrófagos, de las células *Natural Killer* y de las células dendríticas y en la acción del complemento (Mossman, 2002). Las principales citoquinas liberadas son el TNF- α (Lundberg y cols., 2007) y el interferón- α , - β y - γ (INF- α , - β y - γ) (Vollstedt y cols., 2004). Estas citoquinas ejercen su función antiviral activando a las células fagocíticas (Mossman and Ashkar, 2005) y a los componentes del sistema inmune adaptativo (Mossman and Ashkar, 2005; Paladino and Mossman, 2009; Stark y cols., 1998). El INF- α/β limita la progresión del HSV-1 de los tejidos periféricos al SNC (Halford y cols., 2004; Halford y cols., 1997), mientras que el INF- γ , además, controla la infección y la reactivación del virus en el SNC (Mossman, 2002). Entre los mecanismos antivirales desencadenados por el INF se encuentran la inhibición de la síntesis de proteínas virales mediada por la activación de la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) (Garcia y cols., 2007) y la activación de la adenilato sintetasa que se une a la ribonucleasa L celular que degrada el RNA viral (Al-khatib y cols., 2003; Sadler and Williams, 2008).

Por su parte, el HSV-1 posee una serie de proteínas que impiden el correcto funcionamiento del sistema inmune, entre las que se encuentran la proteína del tegumento vhs, que bloquea la síntesis de proteínas celulares impidiendo la producción del INF (Smiley, 2004), la proteína ICP34.5 que contrarresta la acción de la proteína celular PKR permitiendo la síntesis de

proteínas virales (He y cols., 1997) y la glicoproteína C (gC) que se une al componente C3b del complemento inactivando su función (Friedman y cols., 1996).

En relación al sistema inmune adaptativo, el HSV-1 posee la proteína ICP47 que bloquea el transporte de péptidos virales por el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) hasta el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1 (MHC-I), impidiendo el reconocimiento de la célula infectada por los linfocitos CD8⁺ (Lacaille and Androlewicz, 1998), y con la respuesta humoral mediante la interacción de las glicoproteínas gC y gI con la región Fc de la inmunoglobulina G (Sprague y cols., 2004).

Debido a que existe una homeostasis entre el sistema inmune y la infección por HSV-1, el declive del primero determina la disminución de la capacidad del individuo para combatir la infección. El envejecimiento afecta al sistema inmune disminuyendo su capacidad de respuesta y su funcionalidad (Linton and Thoman, 2001) debido al daño oxidativo que sufren todas las células del organismo (De la Fuente and Miquel, 2009). El deterioro del sistema inmune con la edad (denominado inmunosenescencia) repercute sobre las dos variantes de la respuesta inmune, aunque la adaptativa sufre más las alteraciones funcionales asociadas al envejecimiento que la innata (Weiskopf y cols., 2009). La inmunidad innata es funcional desde el nacimiento y manifiesta pocos cambios durante la vida (Linton and Thoman, 2001), aunque se ha demostrado que durante el envejecimiento se disminuye su capacidad de eliminación de patógenos y de activación de la respuesta adaptativa (Plackett y cols., 2004). Por el contrario, la inmunidad adaptativa es inmadura en el nacimiento, se desarrolla rápidamente presentando máxima funcionalidad durante la pubertad, y posteriormente se deteriora progresivamente con el envejecimiento (Linton and Thoman, 2001). El principal acontecimiento asociado al envejecimiento es la involución del timo, el órgano en el que maduran los linfocitos T, y cuya disminución de tamaño se traduce en una reducción del número de linfocitos T disponibles para la generación de una respuesta inmune específica (Pawelec y cols., 2002), por lo que la respuesta linfocitaria a una nueva infección o a una vacunación es deficiente (Maue y cols., 2009). Aproximadamente a los 40 ó 50 años el timo ha reducido prácticamente todo su volumen (Weiskopf y cols., 2009). Además, los linfocitos de memoria y efectores existentes aumentan en número, pero envejecen y disminuyen su funcionalidad (Maue y cols., 2009; Weiskopf y cols., 2009).

2.4. HSV-1 Y FACTORES DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA.

2.4.1. HSV-1 y factores genéticos.

El principal factor de riesgo genético asociado con la EA, el *APOE*, influye de manera dependiente de dosis en la neuroinvasión del HSV-1 en modelos murinos, como se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Burgos y cols., 2002; Burgos y cols., 2006b).

Durante la infección hematógena, los ratones deficientes en *apoE* murino presentan menores niveles virales en el encéfalo que los ratones salvajes, indicando la implicación del *apoE* en la neuroinvasión (Burgos y cols., 2002). Además, ratones humanizados para el *APOE* $\epsilon 4$ presentan mayores cargas de HSV-1 en el encéfalo que los ratones *APOE* $\epsilon 3$ (Burgos y cols., 2003). Este efecto del *apoE* se observa tanto durante la infección aguda (Burgos y cols., 2002) como durante la infección latente (Burgos y cols., 2006b) e incluso durante la transmisión vertical del virus de la madre a la descendencia (Burgos y cols., 2007).

Además, estudios de asociación genética desarrollados en nuestro laboratorio han descrito la asociación de determinados polimorfismos del gen *TAP2* (Bullido y cols., 2007), implicado en la activación de la respuesta inmune frente a la infección por HSV-1, y del gen *PKR* (Bullido y cols., 2008), que se activa ante la respuesta a las infecciones víricas, con un incremento en el riesgo de padecer la EA. Estos dos genes están implicados en la interacción con el HSV-1 lo que refuerza la asociación del virus con la enfermedad. En concreto, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado la estrecha relación existente entre el tap murino y la proteína ICP47 del HSV-1 (Burgos y cols., 2006c), fundamentalmente durante la infección del sistema nervioso. La proteína viral inmediatamente temprana ICP47 bloquea específicamente la ruta de procesamiento de antígenos acoplada al MHC-I, mediante la inhibición del complejo TAP (York y cols., 1994). Esta estrategia viral disminuye las moléculas del MHC-I en la superficie celular y, por tanto, la activación de los linfocitos T CD8⁺ en respuesta a la infección viral (York y cols., 1994), facilitando el proceso de infección del HSV-1. En el trabajo de Burgos y col., se demuestra que la proteína viral ICP47 es esencial en la invasión del encéfalo por parte del HSV-1, ya que el virus defectivo en ICP47 es menos neuroinvasivo que el virus salvaje, y que este virus defectivo recupera la neuroinvasividad cuando el ratón es *knock-out* (deficiente) para tap (Burgos y cols., 2006c).

2.4.2. HSV-1 y daño oxidativo.

Como se ha descrito anteriormente, el daño oxidativo es un acontecimiento temprano en el desarrollo de la EA. Dicho daño puede ser producto del envejecimiento o incluso de otros tipos de estímulos que provocan estrés al organismo. En este sentido, diversos estudios han demostrado que la infección por HSV-1 es capaz de inducir daño oxidativo (Milatovic y cols., 2002; Valyi-Nagy and Dermody, 2005), por lo que en el caso de que el virus estuviera implicado en la patogénesis de la EA, el HSV-1 debería generar un daño oxidativo significativo. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales el HSV-1 es capaz de producir daño en el sistema nervioso aún no están totalmente resueltos. Se postula que el daño neuronal está mediado por la acción directa de proteínas virales o de manera indirecta a través de la señalización inflamatoria generada por el organismo ante la infección (Valyi-Nagy and Dermody, 2005). Estudios de infección aguda en el encéfalo de ratones han determinado que el HSV-1 produce daño oxidativo en los lípidos, determinado por la inmunorreactividad contra el HNE y por la presencia de F_2 -isoprostanos y de F_4 -neuroprostanos (Milatovic y cols., 2002; Valyi-Nagy y cols., 2000), en los ácidos nucleicos (Valyi-Nagy y cols., 2000) y en las proteínas (Marques y cols., 2008). Además, el HSV-1 también induce daño oxidativo durante la infección latente, tal y como se ha observado en el encéfalo y en el ganglio trigémino de los ratones 7 meses después de la infección viral. (Valyi-Nagy y cols., 2000). No obstante, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio de la modulación de los niveles de virus en el encéfalo de los ratones a edades más avanzadas, ni del efecto neurodegenerativo asociado.

2.4.3. HSV-1, inflamación y neuroinflamación.

Otra de las características patológicas de la EA es la detección de marcadores de inflamación en los cerebros de enfermos de alzhéimer y de los pacientes en etapas previas como el deterioro cognitivo leve. Nuevamente, el HSV-1 podría ser el inductor de esta neuroinflamación, puesto que el HSV-1 induce la activación de la respuesta inflamatoria en modelos de infección aguda, tanto *in vitro* como *in vivo* (Linton and Thoman, 2001; Mossman, 2002; Valyi-Nagy and Dermody, 2005), a través de la producción de agentes inflamatorios como las citoquinas, y en la activación del complemento (Mossman, 2002).

En el encéfalo, el HSV-1 aumenta la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Koprowski y cols., 1993; Marques y cols., 2008) que a su vez genera óxido nítrico (NO) y la liberación de diversas citoquinas como el TNF- α y la IL-6 (Shimeld y cols., 1997), por lo que el daño provocado por el virus podría estar producido por la acción directa del NO y por la acción indirecta de los mediadores inflamatorios.

Por otra parte, modelos murinos de infección latente han descrito la presencia de niveles elevados de iNOS (Marques y cols., 2008), indicando que los mecanismos implicados en la producción de daño oxidativo y de inflamación deben ser similares a los descritos durante la fase productiva de la infección, es decir, a la acción directa de proteínas virales generadas en procesos puntuales de reactivación y a la acción de mecanismos inflamatorios defensivos generados por el sistema inmune del organismo infectado (Marques y cols., 2008).

En definitiva, en los últimos años se han acumulado numerosas evidencias que sugieren la posible relación entre el HSV-1 y la patogénesis de la EA. Con estos antecedentes, resulta esencial desarrollar modelos de infección a largo plazo que permitan validar la teoría patogénica de la EA, y en concreto, determinar el efecto de los principales factores de riesgo relacionados con la EA (el envejecimiento, el *apoE*, el género femenino y el daño oxidativo) sobre las cargas virales en el encéfalo. Estos estudios permitirán obtener evidencias en relación con el efecto que ejerce el HSV-1 en el encéfalo y de su posible implicación en la patogénesis de la EA.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

Hasta la fecha, el análisis de la infección por HSV-1 y su posible implicación en la EA se ha centrado en la realización de estudios epidemiológicos en humanos, y a su modelización en sistemas celulares y animales. Estos estudios han permitido conocer la relación existente entre el HSV-1 y algunos de los principales factores de riesgo asociados con la EA, como son el *apoE* y el género femenino. Sin embargo, hasta la fecha no se ha analizado el efecto del envejecimiento, el principal factor de riesgo de padecer la EA, en la infección por HSV-1.

Así pues, el objetivo principal de este trabajo fue analizar experimentalmente la influencia del envejecimiento sobre la infección del HSV-1 en un modelo murino, con especial interés en la acción del virus sobre el encéfalo. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Análisis de la infección hematogena del virus HSV-1 mediante técnicas de imagen molecular.** Estudio de la cinética de infección del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante bioluminiscencia y mediante técnicas clásicas de análisis. Aquí se propone utilizar dicha variante del HSV-1 para la realización de experimentos longitudinales de neuroinfección.
- 2. Evaluación de la influencia del sistema inmune y de la cepa viral en la infección del HSV-1.** Estudio de la resistencia de diferentes cepas de ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos a la infección hematogena por HSV-1 y análisis comparativo de la fase aguda de la infección del HSV-1 KOS/Dlux/oriL y de su virus parental HSV-1 KOS salvaje.
- 3. Estudio del efecto del envejecimiento en la neuroinfección del HSV-1.** Análisis de la influencia del envejecimiento en la neuroinvasión del HSV-1 en ratones salvajes y en un modelo murino de envejecimiento acelerado en ratones con deficiencia parcial en el gen de la superóxido dismutasa 2.
- 4. Estudio de la influencia de los principales factores de riesgo asociados con la EA en asociación con el envejecimiento en la neuroinfección del HSV-1.** Análisis del efecto del género, del *apoE*, de la dosis viral y del daño oxidativo en la infección del encéfalo por el HSV-1
- 5. Análisis de la neurodegeneración causada por HSV-1 en ratones.** Evaluación de la neurodegeneración asociada a la infección por HSV-1 durante las fases aguda y latente de la infección y con el envejecimiento, mediante el análisis neurohistopatológico y de imagen del encéfalo de los ratones, y mediante estudios de fenotipado conductual.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Virus.

Para la realización de los experimentos presentados en este trabajo se ha utilizado la cepa KOS del virus HSV-1, cedido por el Dr. Luis Carrasco del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO), y el virus bioluminiscente HSV-1 KOS/Dlux/oriL, cedido por el Dr. David Leib de la *Washington University*.

El virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL es una modificación genética del virus HSV-1 KOS salvaje, que porta la luciferasa de la luciérnaga americana *Photinus pyralis* y la luciferasa del cnidario *Renilla reniformis*. Este virus fue generado mediante la inserción de un fragmento de DNA que codifica los genes de las luciferasas arriba descritas (bajo el control de los promotores de los genes virales UL29 y UL30), y el origen de replicación de la secuencia larga en el genoma del virus HSV-1 KOS (entre los genes UL49 y UL50). Esta inserción implica la eliminación de 11 aminoácidos de la región carboxilo terminal del gen UL49.5, que no afecta al crecimiento del virus *in vitro*, pero sí a la replicación del virus en tejidos nerviosos *in vivo*, la cual se ve reducida hasta en 10 veces con respecto al virus sin modificar (Luker and Leib, 2005; Summers and Leib, 2002).

4.1.2. Animales.

Durante este trabajo se han utilizado ratones macho y hembra de diferentes fondos genéticos y de diferentes edades (entre 8 semanas y 18 meses), obtenidos de las siguientes casas comerciales:

- 117 ratones C57BL/6-J (Charles Rivers Laboratory, España) denominados a partir de ahora como C57BL/6.
- 56 ratones Hsd:ICR(CD-1[®]) (Harlan Interfauna Ibérica, España) denominados CD-1.
- 20 ratones BALB/c Ola Hsd (Harlan Interfauna Ibérica, España) denominados BALB/C.
- 86 ratones inmunosuprimidos Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} (Harlan Interfauna Ibérica, España) denominados CD-1 *nude*.
- 22 ratones inmunosuprimidos BALB/c Ola Hsd-*Foxn1*^{nu} (Harlan Interfauna Ibérica, España) denominados BALB/C *nude*.

- 35 ratones con deficiencia parcial en el gen de la superóxido dismutasa 2 (*sod2* +/-) B6.129S7-Sod2^{tm1Leb}/J (The Jackson Laboratory, EE.UU.) de fondo genético C57BL/6-J denominados *sod2* +/-.

- 12 ratones deficientes en *apoE* B6.129P2-Apo^{e^{tm1Unc}}/J (The Jackson Laboratory, EE.UU.) de fondo genético C57BL/6-J denominados *apoE* -/-.

4.1.3. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados para el inmunomarcaje en los diferentes experimentos se detallan a continuación.

- Anticuerpos primarios:

- anti-GFAP (DakoCytomation, Dinamarca): anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) que se encuentra en los astrocitos maduros.

- anti-HNE (Japan Institute for the Control of Aging, Japón): anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el producto de la oxidación de los lípidos 4-hidroxi-2-nonenal (HNE).

- anti-HSV-1 (DakoCytomation, Dinamarca): anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la mayoría de las glicoproteínas de la envuelta viral y varias proteínas de la cápsida del HSV-1.

- Anticuerpos secundarios:

- cabra anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.): anticuerpo acoplado a biotina generado en cabra que reconoce las inmunoglobulinas IgG (H+L) de conejo.

- cabra anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.): anticuerpo acoplado a biotina generado en cabra que reconoce las inmunoglobulinas IgG (H+L) de ratón.

- burro anti-IgG de conejo (Invitrogen, EE.UU.): anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa 488 generado en burro que reconoce las inmunoglobulinas IgG (H+L) de conejo.

4.1.4. Sondas fluorescentes usadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.1.4.1. SYBR Green I®.

El SYBR Green I® (Roche Diagnostics Ltd., Reino Unido) es una sonda comercial que se une al DNA de doble cadena (Schneeberger y cols., 1995) y que emite luz fluorescente tras

ser excitada con luz ultravioleta.

4.1.4.2. Sondas *TaqMan*[®]-MGB.

Las sondas *TaqMan*[®]-MGB (Applied Biosystems, EE.UU.) se unen al surco menor del DNA, lo que facilita la consecución de la PCR. Estas sondas presentan una molécula emisora de fluorescencia en el extremo 5' y una molécula captadora (*quencher*) de fluorescencia en el extremo 3'. La ruptura de la sonda que se produce en cada ciclo de amplificación de la PCR, aumenta la intensidad de la fluorescencia (Gelmini y cols., 1997), por lo que se utiliza como indicador de la amplificación del producto deseado.

4.1.5. Reactivos de histología.

4.1.5.1. Dihidrocloreuro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

El DAPI (Sigma, EE.UU.) es una molécula fluorescente permeable a las membranas celulares que se une a la doble cadena del DNA. El complejo con DAPI presenta una longitud de onda de excitación de 364 nm y de emisión de 454 nm. El DAPI se almacenó disuelto en agua a una concentración de 5 mg/ml, y se utilizó a una concentración final de 0.2 µg/ml.

4.1.5.2. Hematoxilina de Mayer.

La hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, EE.UU.) es una solución básica que reacciona con los radicales ácidos de los ácidos nucleicos, por lo que tiñe de forma selectiva la cromatina nuclear sin teñir las estructuras citoplasmáticas. Tras una correcta diferenciación, los núcleos adquieren color azul. Esta solución se utiliza como contratinción nuclear tras la tinción inmunquímica y como tinción estándar junto con la eosina.

4.1.5.3. Eosina Y.

La solución acuosa de eosina Y (Sigma-Aldrich, EE.UU.) es una solución ácida que reacciona con las proteínas ricas en aminoácidos básicos presentes en el citoplasma de las células, formando un complejo de color rosáceo. Dicha solución se acidificó previamente a su uso con 1 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de eosina Y. Las muestras se tiñeron durante 10 segundos con esta solución.

4.1.6. Reactivos Generales.

Todos los reactivos utilizados fueron de alta calidad (grado analítico). A continuación se detalla la procedencia de algunos de ellos:

- El butanol, el isopropanol, el etanol, el xilol, la sal disódica del ácido etilen- diamino- tetraacético (EDTA), el Tween-20, el cloruro sódico, el cloruro magnésico, el hidróxido sódico, el citrato sódico, el ácido cítrico y el ácido clorhídrico fueron obtenidos de la casa comercial Merck (Alemania).

- La albúmina de suero bovino (BSA), el dietilpirocarbonato (DEPC), el azul de bromofenol, el tritón X-100 y el trizma base fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EE.UU.). El sulfato sódico de dodecilo (SDS) fue suministrado por Bio-Rad (EE.UU.) y la proteinasa K por Roche Diagnostics (Alemania).

- La agarosa fue suministrada por GibcoBRL (EE.UU.) y el formaldehído y la parafina por Fluka (Alemania).

A lo largo del manuscrito se describen otros reactivos más específicos y las casas comerciales de procedencia.

4.2. MÉTODOS.

4.2.1 Manipulación de virus.

Los dos virus utilizados (HSV-1 KOS y HSV-1 KOS/Dlux/oriL) fueron cultivados, propagados y titulados sobre monocapa de células Vero (células de riñón de mono africano), en el laboratorio de bioseguridad 2 del CBMSO. El almacenaje se realizó a -70°C en dicho laboratorio.

La infectividad de ambos virus se valoró mediante el recuento de placas de lisis en monocapa de células Vero en medio semisólido (DMEM con 2% de suero fetal de ternera y agar al 0.7%), optimizando un método descrito previamente (Carrascosa y cols., 1982). Las células se crecieron en placas M24 hasta preconfluencia en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera y antibiótico (gentamicina). Se realizaron diluciones seriadas de orden 10 del inóculo viral en medio libre de suero, las cuales se añadieron sobre la monocapa celular (150 µl por pocillo) tras retirar el medio de cultivo. Después de una hora de adsorción, se añadió 1 ml por pocillo de medio semisólido y se dejaron en el incubador a 37°C. Las placas se revelaron a las 48 horas post-infección por tinción con cristal violeta al 1% (en formaldehído

al 5%) durante toda la noche. Después de lavar con agua se procedió al recuento de las placas de lisis. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa (ufp) por ml.

4.2.2. Manipulación de los ratones.

Todas las intervenciones practicadas a los ratones fueron llevadas a cabo bajo la autorización, supervisión y ayuda del personal de los animalarios donde se realizaron los diferentes experimentos: CBMSO, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid y “Centre for Genomic Regulation” de Barcelona. Los tratamientos y manipulaciones a los que se sometieron los animales estuvieron sujetos a los métodos descritos en el acta de procedimientos científicos para animales de laboratorio de la Unión Europea (1986) (Wootton and Flecknell, 1987).

En el CBMSO los ratones fueron alojados en cubetas de tipo 2 con una superficie de 425 cm² y capacidad máxima de 6±1 animales, o de tipo 3 con una superficie de 800 cm² y capacidad para 13±1 animales. Estas condiciones están contempladas en las normas generales para el alojamiento de animales durante la experimentación, descritas en el Boletín Oficial del Estado nº251 del viernes 21 de octubre de 2005, anexo II, figura 1. Los ratones pasaron un período de cuarentena y adaptación de 2 semanas en la sala destinada a tal efecto del animalario del CBMSO. Desde su llegada hasta el punto final de los experimentos los ratones se mantuvieron en condiciones de esterilidad, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 22±1°C, con agua y alimento estándar *ad libitum* (Teklad global 18% protein roden diet, Italia).

Todas las manipulaciones se ejecutaron en una cabina de flujo laminar, teniendo la máxima precaución para evitar cualquier contaminación, para lo cual se utilizó material estéril (jeringuillas, agujas, pipetas, tijeras, pinzas, escalpelos, etc.) cambiando el material para cada grupo de ratones. El vestuario utilizado en este laboratorio constaba de traje plastificado Tyvek® con capucha, mascarilla, patucos de papel y guantes de látex.

4.2.2.1. Mantenimiento y expansión de las colonias de ratones transgénicos.

El mantenimiento y la expansión de las líneas de ratones transgénicos se desarrolló en la zona del animalario destinada exclusivamente a tal fin. La línea de ratones *apoE* ^{-/-} se mantuvo mediante cruces entre hermanos de camada. La línea de ratones *sod2* ^{+/-} se mantuvo mediante el cruce de ratones con deficiencia parcial en dicho gen con ratones salvajes hermanos de camada. En ambos casos las hembras preñadas se separaron de los machos y se individualizaron en

cubetas acondicionadas para el parto. Las crías se mantuvieron con la madre hasta los 21 días post-parto, momento en el que se destetaron, se separaron por géneros, se identificaron y se les practicó una biopsia caudal de unos 5 mm con objeto de extraer una muestra de DNA.

4.2.2.1.1. Extracción del DNA genómico.

Las muestras de cola fueron incubadas durante toda la noche a 56°C con 750 µl de una solución formada por NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH=8.0), EDTA 100 mM (pH=8.0), SDS 1% y proteinasa K (0.5 mg/ml) en agua destilada. A continuación, se agitó la mezcla para homogeneizar el producto digerido y se le añadió 250 µl de una solución de NaCl saturado. Se mezcló y se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a máxima velocidad. Seguidamente, se separaron 750 µl de sobrenadante que se mezclaron con 500 µl de isopropanol para la precipitación del DNA. A continuación, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a máxima velocidad y se retiró el sobrenadante con cuidado. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante se retiró teniendo precaución de no arrastrar el precipitado y, una vez evaporado todo el etanol restante, el precipitado de DNA fue resuspendido en 150 µl de agua purificada estéril.

4.2.2.1.2. Análisis del genotipo.

Para el análisis del genotipo de los ratones *sod2* +/-, se eligió la técnica de la PCR debido a su alta especificidad y rapidez. El protocolo utilizado es el descrito por la casa comercial *The Jackson Laboratory*. Dichos ratones se generaron reemplazando los exones 1 y 2 del gen *sod2* por un transgén humano (*PgkHPRT*) (Lebovitz y cols., 1996), por lo que para identificar a estos ratones se amplificaron 240 pares de bases (pb) de ese transgén. Además, para comprobar la calidad del DNA empleado y como control interno de la correcta consecución de la PCR, se amplificaron en el mismo tubo de reacción 123 pb del exón 2 del gen murino *sod2*. La reacción de PCR se puso a punto en el sistema Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, EE.UU.). Para ello, se añadió 1 µl de DNA (50 ng) a una mezcla de reacción de 25 µl de volumen final conteniendo MgCl₂ 2 mM, tampón PE 1X (Biotools, España), dNTP (desoxinucleótidos-trifosfato) 100 µM (Applied Biosystems, EE.UU.), los oligonucleótidos correspondientes a una concentración de 0.8 µM, Taq DNA polimerasa 0.04 U/µL (Biotools, España) y agua purificada. Dicha reacción se sometió a los siguientes procesos:

- Preincubación: 1 minuto a 95°C.
- Amplificación: 35 ciclos.

- Desnaturalización: 30 segundos a 94°C.
- Anillamiento: 1 minuto a 61°C.
- Extensión: 1 minuto a 72°C.
- Extensión: 10 minutos a 72°C.

Finalmente, todas las reacciones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio (Roche, Alemania) a 0.5 µg/ml para comprobar que el tamaño de los amplificadores se correspondía con el esperado en cada caso.

4.2.2.2. Inoculación, marcaje y seguimiento.

Los ratones fueron inoculados mediante una inyección ip de 100 µl de volumen con una suspensión de HSV-1 (KOS o KOS/Dlux/oriL) en tampón fosfato salino (PBS). Se ha descrito que esta vía de inoculación mimetiza la infección hematogena del virus (Burgos y cols., 2002a; Johnson, 1964). En cada experimento se incluyeron ratones sin infectar como controles, a los que se les inoculó únicamente PBS. Todos los animales utilizados fueron marcados individualmente para su identificación y posterior seguimiento diario.

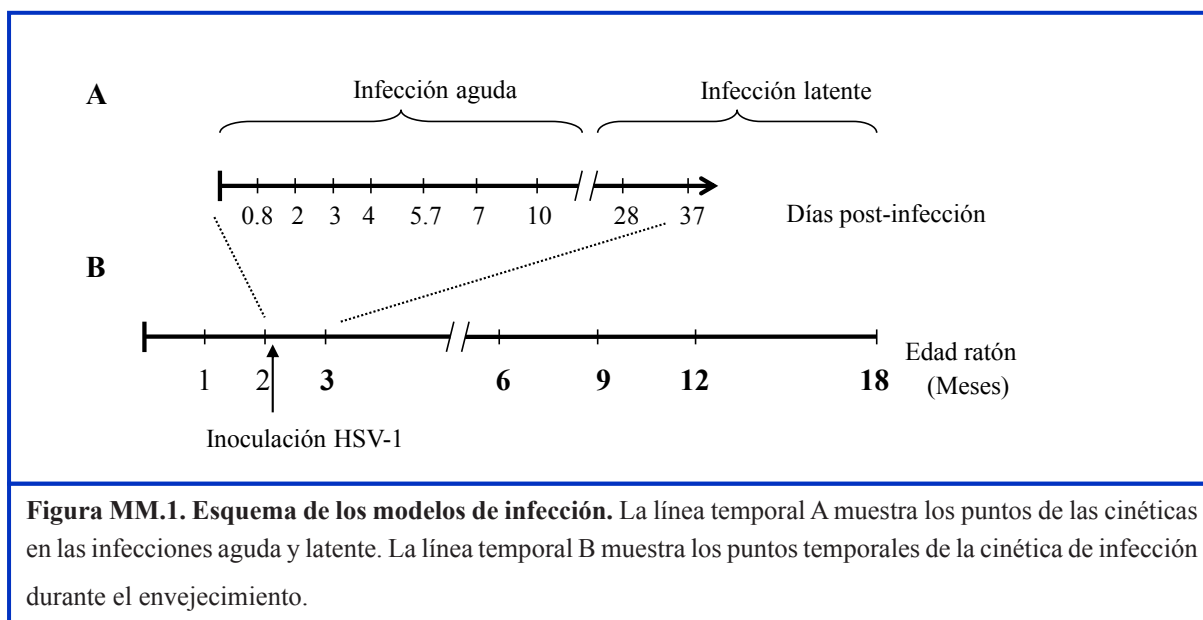
4.2.2.3. Modelos de infección.

Tras la inoculación ip del virus se estudiaron las distintas fases en las que se divide la infección del HSV-1:

-Fase aguda: Se establece que los ratones se encuentran en estado de infección aguda desde el momento de la inoculación hasta la latencia. Se considera que esta fase dura aproximadamente 3 ± 1 semanas (Roizman, 1996). Tras la inoculación, el virus se replica en las zonas próximas al sitio de primoinfección y se disemina por el organismo, preferencialmente a los tejidos nerviosos. En este modelo estudiamos la progresión del virus hasta los 10 días tras la inoculación.

-Fase latente: Durante la fase latente el virus limita la expresión de sus genes a un grupo reducido de los mismos denominados *LAT*, que inician, mantienen y regulan el estado de latencia del virus. Está establecido que a partir de los 28 días el virus se encuentra en estado de latencia (Roizman, 1996). Para los experimentos realizados aquí se utilizaron animales infectados asintomáticos tras, al menos, 37 días de infección, lo que asegura la presencia del genoma viral de forma latente en el organismo. Los experimentos para estudiar la infección

durante el envejecimiento y la neurodegeneración asociada fueron realizados a partir de los 3 meses de edad y cuando el virus había alcanzado el estado de latencia (figura MM.1.).

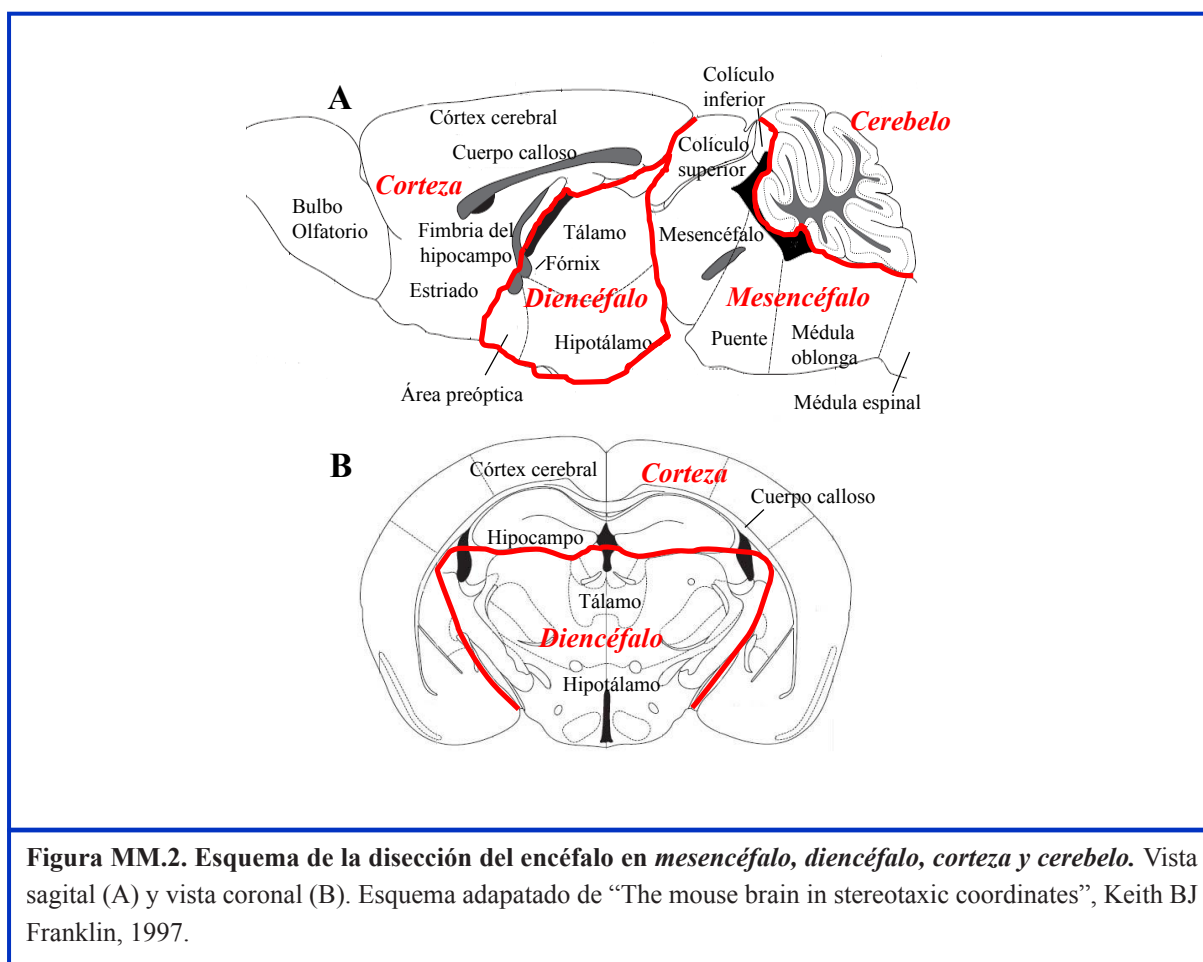


4.2.2.4. Sangrado.

El sangrado se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en el laboratorio de nivel 2 de bioseguridad del animalario del CBMSO. Todos los ratones fueron sangrados por punción con una lanceta en la vena submaxilar. La sangre fue depositada en tubos de 1.5 ml conteniendo 10 µl de EDTA al 9% para evitar la coagulación, siendo posteriormente almacenada a -70°C.

4.2.2.5. Sacrificio, disección y tratamiento de las muestras para extracción de DNA y de proteínas.

Los animales fueron sacrificados individualmente mediante sobredosis de CO₂ inhalado en una cubeta estanca. A continuación, se procedió a la disección y extracción de los siguientes órganos y tejidos: gónadas, glándulas adrenales, nódulos mesentéricos, medula espinal, ganglios trigéminos y encéfalo. El encéfalo de los ratones fue dividido en cuatro partes que denominamos de forma arbitraria: *mesencéfalo* (que además del mesencéfalo incluye los colículos superior e inferior, el puente, la médula oblonga y la parte superior de la médula espinal), *corteza* (que incluye el córtex cerebral, el hipocampo, la fimbria del hipocampo, el cuerpo calloso, el estriado y los bulbos olfatorios), *diencéfalo* (que incluye el tálamo, el hipotálamo, el fórnix y el área preóptica) y *cerebelo* (figura MM.2.). Todos los órganos fueron congelados y almacenados a -70°C.



Previamente a la extracción del DNA y de las proteínas, los tejidos fueron homogeneizados mecánicamente en tubos de 1.5 ml conteniendo 400 μ l de PBS con DEPC al 0.1%. en un homogeneizador Retsch® MM300 (Haan, Alemania)

El DNA fue extraído a partir de 50 μ l de sangre o de muestra homogeneizada, siguiendo los protocolos de dos métodos convencionales de extracción en columna: *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y *DNeasy 96® Blood & Tissue Kit QIAamp* (Qiagen GmbH, Alemania). El DNA purificado en la columna fue eluido con agua purificada estéril y almacenado a -20°C para su óptima conservación.

Las proteínas fueron extraídas a partir de 50 μ l de muestra homogeneizada a la que se añadió 50 μ l de tampón de lisis 5X (CCLR, Luciferase Assay System, Promega, EEUU) y 150 μ l de PBS. Posteriormente, la mezcla fue sometida a 3 ciclos de congelación a -80°C y descongelación de 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó la mezcla a 1870 x g durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante que se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.2.2.6. Perfusión, disección y tratamiento de las muestras para estudios histológicos.

Previamente a la perfusión, los animales fueron anestesiados mediante una inyección ip de una solución en suero fisiológico (15 ml/kg de peso) conteniendo 2% de Rompun® (Bayer, Alemania) y 50 mg/ml de Ketolar® (Parke-Davis, EE.UU.). Posteriormente, los ratones fueron perfundidos intraventricularmente con 10 ml de PBS seguidos de 10 ml de una dilución de formaldehído al 10% en PBS. A continuación, se extrajo el encéfalo al que se le practicó un corte sagital para dividir los dos hemisferios, los cuales se introdujeron individualizados e identificados en casetes de inclusión dentro de un baño de formaldehído al 10% en PBS durante 18 horas, para la correcta fijación de los tejidos. Tras este tiempo se lavaron las muestras con PBS para eliminar el exceso de fijador y se sometieron a una deshidratación seriada según el siguiente protocolo:

- I. Etanol 70%: 30 minutos en agitación.
- II. Etanol 80%: 30 minutos en agitación.
- III. Etanol 96%: 30 minutos en agitación.
- IV. Etanol 100%: 30 minutos en agitación.
- V. Etanol 100%: 1 hora en agitación.
- VI. Butanol 100%: 1 hora en agitación.
- VII. Butanol 100%: toda la noche en agitación.
- VIII. Butanol 100%: 2 horas en agitación.

Tras la deshidratación, se procedió a la inclusión de las muestras en parafina:

- IX. Parafina (punto de fusión: 56-58°C): 2 horas en estufa a 60°C.
- X. Parafina (punto de fusión: 56-58°C): toda la noche en estufa a 60°C.
- XI. Parafina (punto de fusión: 56-58°C): 3 horas en estufa a 60°C.

Una vez concluido este proceso, las muestras se situaron en moldes de plástico conteniendo parafina líquida (a 60°C) en la estufa. A continuación, se sacaron los moldes con la muestra a temperatura ambiente hasta el solidificado de la parafina. Finalmente, se separaron los bloques de los moldes de plástico y se almacenaron en un lugar fresco y seco.

4.2.3. Cuantificación del DNA mediante PCR cuantitativa.

Se utilizó la PCR a tiempo real (o PCR cuantitativa) para cuantificar tanto el DNA viral como el DNA endógeno presente en los diferentes tejidos. Se emplearon dos protocolos [previamente puestos a punto en el laboratorio (Burgos y cols., 2002b; Ramirez Moreno, 2006)] para la realización de la PCR. El primero se basa en la detección de la fluorescencia emitida por el fluoróforo intercalante *SYBR Green I*[®] en el termociclador *LightCycler*[®] (Roche Diagnostics Ltd, Gran Bretaña). El segundo protocolo se basa en la detección de la fluorescencia emitida por el fluoróforo presente en la sonda *TaqMan*[®]-*MGB*. Durante la consecución de la PCR dicha sonda se rompe, permitiendo la liberación del fluoróforo y la emisión de fluorescencia. Esta reacción se lleva a cabo en el sistema *ABI Prism 7900HT SD*[®] (Applied Biosystems, EE.UU.).

4.2.3.1. PCR cuantitativa con *SYBR Green I*[®].

La PCR cuantitativa se desarrolló siguiendo el protocolo puesto a punto previamente en el laboratorio (Burgos y cols., 2002b) en un termociclador *Light Cycler*[®]. Para la detección del genoma viral se amplificó un fragmento de 110 pb de la *timidin kinasa* del HSV-1 KOS y para la detección del DNA del ratón se amplificó un fragmento de 379 pb del gen de la *β-actina* de ratón. En ambos casos, para realizar la cuantificación se utilizaron rectas patrón de concentraciones conocidas de copias virales y de DNA genómico de ratón. La cantidad de DNA viral en las diferentes muestras se expresó como el número de genomas virales por 100 ng de DNA genómico de ratón.

De forma breve, las reacciones de amplificación fueron optimizadas para un volumen total de 10 µl, conteniendo 2 µl de DNA problema y 8 µl de la mezcla de reacción formada por los siguientes componentes: *Fast Star DNA Master SYBR Green I*[®] (Roche Diagnostics Ltd., Gran Bretaña) que incluye la polimerasa, los nucleótidos y el tampón; los oligonucleótidos directo y reverso (0.5 µM); MgCl₂ (2 mM) y agua purificada estéril. En la tabla MM.1. se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. Las condiciones específicas de cada reacción de PCR se detallan en la tabla MM.2. Todos los experimentos de detección y cuantificación fueron realizados al menos por triplicado.

Fragmento amplificado	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido reverso (5'-3')	Tamaño amplificado
<i>timidin kinasa</i>	ATACCGACGATCTG CACCT	TTATTGCCGTGCGG	110 pb
<i>β-actina</i>	AACCCTAAGGCCAAC CGTGAAAAGATGACC	CCAGGGAGGAAG AGGATGCGGC	379 pb

Tabla MM.1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.

	Preincub	Amplificación				Desnatural
Fragmento amplificado	1 Ciclo	Ciclos	Desnatural.	Anillamiento	Extensión	1 Ciclo
<i>timidin kinasa</i>	95°C 10min	50	95°C 15s	60°C 5s	72°C 10s	De 65°C a 95°C (0.1°C/s)
<i>β-actina</i>		45	95°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	

Tabla MM.2. Condiciones experimentales de las distintas reacciones de PCR. Preincub: Preincubación; Desnatural: Desnaturalización.

4.2.3.2. PCR cuantitativa con sondas *TaqMan*[®]-MGB.

La PCR cuantitativa con sondas *TaqMan*[®]-MGB se realizó siguiendo el protocolo puesto a punto previamente en el laboratorio (Ramirez Moreno, 2006) en un sistema *ABI Prism 7900HT SD*[®].

Para la detección del genoma viral se empleó una sonda *TaqMan*[®]-MGB específica de una secuencia incluida dentro del locus génico US12 del HSV-1: (5'-3') AGGCGGCCAGAACC. Brevemente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl con 2 µl de DNA problema y 8 µl de una mezcla de *PCR universal* (Applied Biosystems, EE.UU.) con los siguientes oligonucleótidos:

Directo (5'-3'): CGTACGCGATGAGATCAATAAAAGG

Reverso (5'-3'): GCTCCGGGTCGTGCA

Para la detección del DNA genómico de ratón se utilizó un ensayo comercial prediseñado para el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*gapdh*; código: Mm99999915_gl, Applied Biosystems, EE.UU.). Tanto para la cuantificación del DNA viral como del DNA endógeno de ratón se emplearon rectas patrón. Todos los experimentos de detección y cuantificación fueron realizados al menos por triplicado.

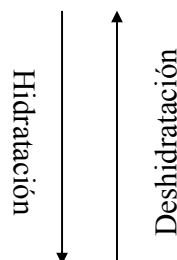
Finalmente, la cantidad de DNA viral en las diferentes muestras se expresó como el número de genomas virales por 100 ng de DNA genómico de ratón.

4.2.4. Histología e inmunohistoquímica.

Para el estudio de la morfología celular y de la pérdida neuronal, se utilizó la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Para la detección de antígenos virales, marcadores neuronales y marcadores de daño oxidativo, se emplearon dos técnicas inmunohistoquímicas (IHQ): IHQ de campo claro (método avidina-biotina-peroxidasa) e IHQ de fluorescencia.

Para todos los estudios histológicos, se realizaron cortes de tejido de 6 μm de grosor en un microtomo RM2125RT (Leica, Alemania) a partir de los órganos embebidos en parafina. Dichos cortes fueron desparafinados e hidratados según el siguiente esquema:

- Xilol: 20 minutos en agitación.
- Xilol: 20 minutos en agitación.
- Etanol 100%: 10 minutos en agitación.
- Etanol 100%: 10 minutos en agitación.
- Etanol 96%: 5 minutos en agitación.
- Etanol 80%: 5 minutos en agitación.
- Etanol 70%: 5 minutos en agitación.
- Agua destilada: 5 segundos en agitación.
- PBS



A partir de aquí, y en función de la técnica a utilizar, se siguieron diferentes protocolos:

Para la tinción con H&E, las muestras una vez hidratadas se incubaron con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se lavaron durante 1 minuto con agua corriente para eliminar el exceso de hematoxilina y conseguir que

la tinción virase hasta el color deseado. A continuación, se incubaron durante 10 segundos con eosina Y al 1% en ácido acético. Finalmente, se lavaron con etanol al 70%, se deshidrataron siguiendo el esquema anterior y se montaron con cubreobjetos utilizando el medio de montaje DePeX (BDH, Inglaterra).

En el caso de la IHQ de campo claro, los cortes fueron incubados con tampón citrato (0.1M; pH=6.0) durante un minuto en una olla a máxima presión (Norton y cols., 1994) o, alternativamente, incubados con 10 mg/ml de proteinasa K en PBS durante 30 minutos para desenmascarar al antígeno. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se incubaron durante 30 minutos en una cámara húmeda con una solución de bloqueo formada por suero normal de cabra o suero normal de caballo 5%, BSA 1% y PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T), para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Tras este proceso, se incubaron durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo primario diluido en una solución 1/10 de tampón de bloqueo. Transcurrido el tiempo indicado se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-T y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con una dilución al 3% de peróxido de hidrógeno en PBS para bloquear la peroxidasa endógena. Nuevamente, se lavaron las muestras 4 veces con PBS-T durante 5 minutos y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en una solución 1/10 de tampón de bloqueo. Tras 4 nuevos lavados con PBS-T, los cortes fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa “PK-6100” (Vector lab., EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se lavaron con PBS para eliminar el exceso de complejo y se revelaron con el substrato de diaminobenzidina “ImmPACT DAB Peroxidase Substrate SK-4105” (Vector lab., EE.UU.). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Mayer para resaltar la arquitectura celular. Por último, las preparaciones sufrieron un proceso de deshidratación siguiendo el esquema anterior y fueron montadas con cubreobjetos utilizando el medio de montaje DePeX.

Para la detección viral, se empleó también la técnica de IHQ de fluorescencia. El protocolo utilizado para esta técnica difiere del usado para la IHQ de campo claro en que no requiere incubar las muestras con peróxido de hidrógeno. Además, las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una dilución del anticuerpo primario en PBS-T. A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y se incubaron durante 1 hora en una dilución en PBS-T de anticuerpo secundario unido a fluoróforo. Posteriormente, se lavaron las preparaciones y se incubaron durante 10 minutos con una solución conteniendo 0.2 µg/ml de DAPI para marcar los núcleos de las células. Finalmente, se lavaron y se montaron en medio acuoso *Aquatex* (Merck, Alemania).

En todos los experimentos se realizaron pruebas en paralelo para descartar marcajes inespecíficos. Estas pruebas consistieron en la inclusión de muestras de ratones control y en el análisis de secciones contiguas de los controles positivos incubados sin anticuerpo primario, sin anticuerpo secundario o sin complejo avidina-biotina-peroxidasa. Además, se examinaron al menos 3 cortes de cada una de las muestras problema para confirmar los resultados obtenidos.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiovert 200* (Zeiss, Alemania) o en un microscopio de campo claro *Olympus BX41* (Olympus, Barcelona). Las imágenes se adquirieron con una cámara *SPOT RT Slider* (Diagnostic, EE.UU.) empleando el software *Metavue*, o bien con una cámara *UC30* (Olympus, Barcelona) empleando el software *Get it* de Olympus. El tratamiento final de las imágenes se realizó con el programa *Adobe® Photoshop® 7.0* (Adobe Systems Incorporated, EE.UU.).

4.2.5. Cuantificación de la carga de HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante imagen por bioluminiscencia.

Los ensayos de imagen por bioluminiscencia se realizaron en un equipo *IVIS®* (Xenogen Corp., EE.UU.) unido a un ordenador con sistemas *Living Image™* (Xenogen Corp, EE.UU.) e *IGOR* (Wavemetrics, EE.UU.). El equipo *IVIS®* está formado por una cámara CCD con sistema de refrigeración, una unidad de control para la cámara, y una cabina oscura donde se depositan los animales para su análisis.

La bioluminiscencia consiste en la emisión de luz por parte de un organismo vivo. Esta emisión es producto de la reacción de oxidación de la luciferina catalizada por la enzima luciferasa. Para determinar la carga de HSV-1 KOS/Dlux/oriL, los ratones infectados con dicho virus fueron inoculados ip con 100 µl de una solución 10 mM de D-luciferina (Xenogen Corp., EE.UU.) en PBS (15 mg de D-luciferina/kg de ratón). La D-luciferina es fotosensible, por lo que se mantuvo protegida de la luz durante todo el ensayo. Tras un período de 5 minutos de biodistribución de la D-luciferina, los animales fueron anestesiados mediante inoculación ip con una dosis de 0.02 ml de Avertin al 1.2% (formado por 2,2,2-tribromoetanol y alcohol tert-amílico; Sigma Aldrich, EE.UU.) por gramo de ratón. Finalmente, a los 10 minutos tras la administración de la D-luciferina se inició la adquisición de la señal. Primero, se tomó una imagen en blanco y negro de cada ratón (a la que se superpuso la señal luminosa), usando los siguientes parámetros: campo de visión (distancia del ratón a la cámara) en posición C, tiempo de exposición de 0.2 segundos, resolución media, filtro abierto y apertura (f/stop) 8. A continuación, se inició la adquisición de luz aplicando los siguientes parámetros: campo de visión en posición C, tiempo de exposición (o tiempo de adquisición de luz) de 10 minutos para

las imágenes dorsales y de 5 minutos para las imágenes ventrales, filtro abierto y apertura (f/stop) 1. No se detectó señal en los ratones sin infectar ni en los ratones infectados con HSV-1 KOS/Dlux/oriL previamente a la inoculación intraperitoneal de la D-luciferina.

Para cuantificar la luz recogida por la cámara, se definió una región de interés (ROI) que abarcaba la totalidad de un ratón (4.8 cm x 6.1 cm). La cantidad de luz obtenida por dicha ROI se determinó para los ratones problema y para los ratones control, sustrayendo a los primeros la señal obtenida de estos últimos, con el objeto de que la señal cuantificada se debiera únicamente a la presencia de la luciferasa del virus. Los resultados obtenidos fueron normalizados por tiempo y expresados como el número de fotones que detectaba la cámara por estereorradián por segundo y por centímetro cuadrado.

4.2.6. Cuantificación de la carga de HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante medida de la cantidad de luz *in vitro*.

La cuantificación de la carga viral mediante medida de la cantidad de luz *in vitro* se realizó en un luminómetro *MonoLight 2010* (Analytical Luminescence Laboratory, EE.UU.). Se determinó la cantidad de luz emitida por un extracto de proteínas proveniente de ovarios o de glándulas adrenales. Para ello, se depositaron 20 µl de dichos extractos en un tubo de cristal (Sarstedt, Alemania) que se introdujo en la cámara de medida del luminómetro. Tras la inyección automática de 100 µl de *Luciferase Assay Reagent* (cat. E1500; Promega, EE.UU.) en la muestra, se cuantificó la emisión de luz producto de la reacción. La emisión de luz de cada una de las muestras fue determinada por duplicado. A su vez, se determinó por el método BCA (Pierce, Alemania) la cantidad total de proteína presente en cada una de las muestras. Finalmente, los resultados se expresaron en unidades relativas de luz normalizadas por gramo de proteína (URL/g proteína).

4.2.7. Estudios de resonancia magnética de imagen y de espectroscopía.

Los estudios de RMI y de espectroscopía se llevaron a cabo en un equipo horizontal Bruker PharmaScan de 7.0 Teslas (Bruker Medical GmbH, Alemania) de 16 cm de diámetro, bajo el control del software ParaVision® (Bruker Medical GmbH, Alemania). Dicho equipo está situado en las instalaciones del Servicio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid.

Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 3% en aire. Durante el experimento la concentración de isoflurano inhalado se mantuvo entre el 0.5%

y el 1%. En todo momento, se registraron y controlaron las constantes vitales de los ratones (ritmo cardíaco y temperatura corporal). Además, la temperatura corporal se mantuvo a $37\pm 1^\circ\text{C}$ mediante el uso de un sistema de control automático de temperatura. Antes de introducir al animal, se situó sobre la cabeza de éste una bobina de radiofrecuencia de superficie PharmaScan (Bruker Medical GmbH, Alemania) diseñada específicamente para el estudio del encéfalo de los ratones.

Se registraron imágenes encefálicas pesadas en T2, imágenes para el estudio de la transferencia de magnetización, y señales de resonancia para la realización de un estudio espectroscópico. Dicho estudio espectroscópico se realizó en una región del cerebro delimitada por un vóxel (cubo) de 3 mm de lado y que comprendía parte de la corteza, del hipocampo y del tálamo, como se observa en la figura MM.3.

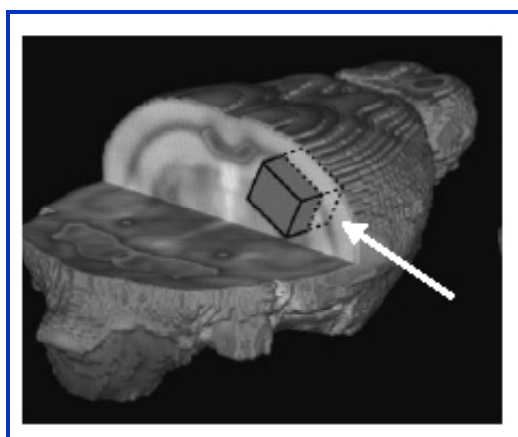


Figura MM.3. Esquema tridimensional del encéfalo de un ratón. Esta imagen ilustra el volumen cúbico cerebral seleccionado durante el estudio espectroscópico, que comprende el hipocampo y parte de la corteza y del tálamo. Adaptada de (Oberg y cols., 2008).

A continuación, se detallan los principales parámetros de cada una de las imágenes registradas.

- Imágenes anatómicas pesadas en T2. Secuencia de eco de espín: RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*); Tiempo de Eco efectivo (TE): 60 ms; Tiempo de Repetición (TR): 2500 ms; factor RARE: 8; campo de visión (FOV): 23 mm x 23 mm; matriz: 256 x 256; resolución en el plano $90 \times 90 \mu\text{m}^2$; número de secciones (*Slice number*): 15 coronales, 12 sagitales, 10 axiales; anchura de la sección (*Slice thickness*): 1 mm.

- Imágenes con contraste por transferencia de magnetización. Secuencia: MSME (*MultiSlice MultiEcho*); Tiempo de Echo (TE): 9.76 ms; Tiempo de Repetición (TR): 2500 ms; campo de visión (FOV): 23 mm x 23 mm; matriz: 128 x 128; resolución en el plano $180 \times 180 \mu\text{m}^2$; número de rodajas (*Slice number*): 8; anchura de la rodaja (*Slice thickness*): 1.2 mm, orientación: coronal. Se obtuvieron dos imágenes con los parámetros arriba descritos: la primera con un tren de pulsos de radiofrecuencia (50 pulsos de $5.5 \mu\text{T}$) desplazado 1500 Hz con respecto a la frecuencia

de resonancia del agua libre), para lograr un fenómeno de transferencia de magnetización y la segunda sin él. Las imágenes con contraste por transferencia de magnetización (TM) se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Mapa TM (\%)} = \frac{\text{Imagen sin tren de pulsos} - \text{Imagen con tren de pulsos}}{\text{Imagen con tren de pulsos}} \times 100$$

- Señal espectroscópica. Secuencia: PRESS (*Point-REsolved SpectroScopy*); Tiempo de Echo (TE): 35 ms; Tiempo de Repetición (TR): 3000 ms; tamaño de vóxel: 3 mm x 3 mm x 3 mm (27 mm³). Número de acumulaciones: 128. Además, para suprimir la señal del agua se utilizó una secuencia VAPOR.

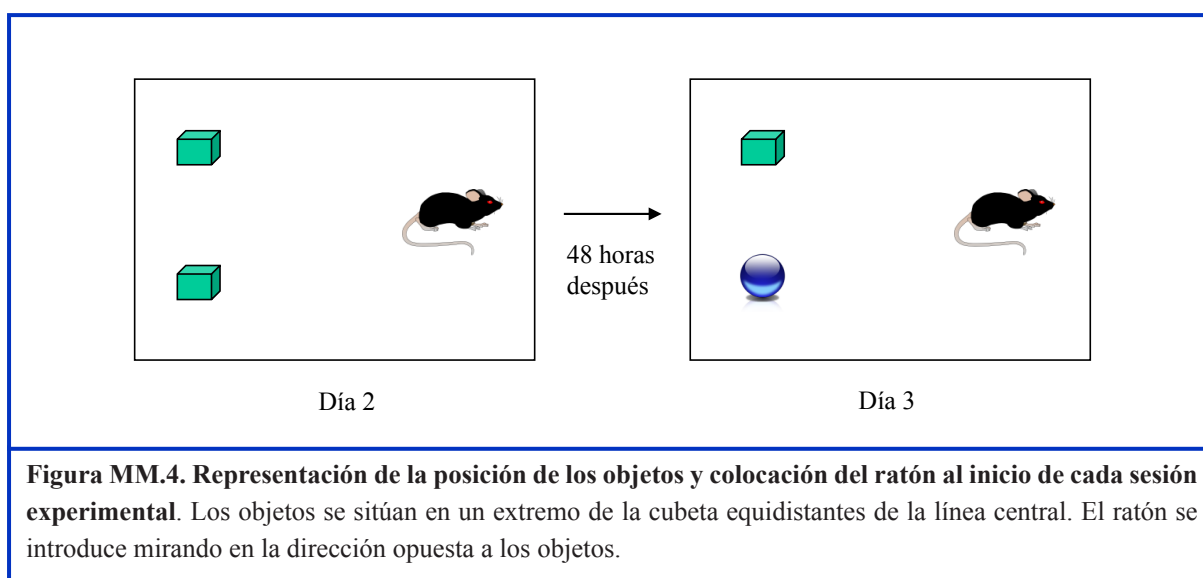
Los datos obtenidos por cada una de estas secuencias en formato ParaVision® (Bruker Medical GmbH, Alemania) se transformaron en imágenes mediante el programa *Image J*. Los mapas de transferencia de magnetización se elaboraron mediante el procesamiento de las imágenes con un software elaborado por el grupo del Dr. Sebastián Cerdán del Instituto de Investigaciones Biomédicas con el lenguaje de programación IDL (Iterative Data Language; Research System, Boulder-EEUU). Por su parte, los espectros de resonancia se obtuvieron mediante el programa MestReC (MestreLab Research, España). Una vez obtenidos dichos espectros, se determinó la relación de las áreas de los picos de resonancia de la N-acetil aspartato (NAA) y de la creatina (Cre; que se utilizó como referencia).

4.2.8. Test de memoria: reconocimiento de objetos.

Los estudios de memoria se ensayaron mediante el test de reconocimiento de objetos. Este test se basa en la tendencia natural que presentan los roedores en explorar durante más tiempo un objeto nuevo (que aparece ante ellos por primera vez) que un objeto conocido (ya explorado) (Berline, 1950).

Para la realización de este test, se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 infectados con HSV-1 KOS y ratones control de la misma cepa y edad. Los diferentes ensayos se realizaron manteniendo las mismas condiciones ambientales y experimentales, es decir, a la misma hora, durante los mismos días de la semana, en el mismo ambiente y por el mismo operador para evitar la influencia de agentes externos en el proceso de reconocimiento. El primer día de experimentación (sesión de habituación), los animales se introdujeron de uno en uno en la cubeta de experimentación (40 cm de largo x 20 cm de ancho x 20 cm de alto) durante 3 minutos, con el objetivo de que se familiarizaran con las condiciones experimentales. Los animales se

depositaron en la cubeta mirando a la pared (ver figura MM.4.). Al día siguiente (segundo día de experimentación o día 2), se colocaron dos objetos iguales (dos cubos de mármol blanco) equidistantes de la línea central de la cubeta en el extremo opuesto al de entrada de los animales y se introdujeron los ratones, los cuales permanecieron durante 3 minutos explorando los objetos. Previamente a la realización de los experimentos, se comprobó que ningún objeto en sí mismo ni ninguna localización de los mismos producía un efecto preferencial en los ratones. Tras 48 horas de retención (día 3 de experimentación), los animales se introdujeron del mismo modo en la cubeta que esta vez contenía el objeto familiar (un cubo de mármol) y un objeto “nuevo” o no explorado aún (una esfera de cristal transparente), para que exploraran durante tres minutos ambos objetos. Todos estos procesos fueron grabados mediante una cámara conectada a un ordenador portátil con el programa *Windows Movie Maker*. Los videos fueron visualizados y se contabilizó el tiempo que dedicó cada ratón a la exploración de cada uno de los objetos. Se consideró tiempo de exploración al tiempo que cada ratón estuvo observando los objetos de forma directa, a una distancia menor a 1 cm. De forma experimental se comprobó que el tiempo de exploración se correspondía con el número de veces que los animales se aproximaban al objeto de forma directa, por lo que para simplificar el proceso se tuvo en cuenta el número de aproximaciones. Además, se determinaron otros comportamientos que presentaron los ratones durante la exploración, como por ejemplo: la actividad general, el *freezing* (inmovilidad), el *rearing* (alzamiento sobre las patas traseras) o la tendencia a escarbar en el lecho de viruta. El número de veces que los ratones exploraron el objeto nuevo se dividió por el número de exploraciones del objeto conocido. Un valor (ratio) mayor de 1 indica que los ratones tienen intacta su memoria, por el contrario un valor menor o igual a 1 indica que han perdido capacidad de recordar (Bevins and Besheer, 2006).



4.2.9. Análisis estadístico.

Se emplearon diferentes análisis estadísticos en función del grupo de datos bajo análisis. Para las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se utilizó el test χ^2 . Para la comparación de las cargas virales entre los diferentes grupos se utilizó el test exacto de Fisher. Las diferencias consideradas significativas se indican con el p-valor correspondiente en el pie de las figuras.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

5.1. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN HEMATÓGENA PRODUCIDA POR EL HSV-1 KOS/Dlux/oriL EN RATONES CD-1.

Con el objetivo de caracterizar la progresión y la distribución del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL, se llevó a cabo una serie de experimentos de infección hematógena en ratones hembra CD-1. Se utilizaron tres técnicas experimentales para cuantificar la carga viral de los diferentes órganos estudiados durante la fase aguda de la infección: bioluminiscencia *in vivo*, PCR cuantitativa y luminiscencia *in vitro*.

5.1.1. Seguimiento mediante bioluminiscencia *in vivo*.

La bioluminiscencia es una técnica de imagen que permite estudiar de forma no invasiva un amplio número de fenómenos biológicos que se dan en células y en pequeños animales. Para ello, es necesario que la célula, la proteína o el patógeno a estudiar se encuentre asociado a la luciferasa, que actúa como proteína reportera.

El HSV-1 KOS/Dlux/oriL es una modificación de la cepa KOS salvaje del HSV-1, que porta en su genoma el gen de la luciferasa de la luciérnaga americana *Photinus pyralis* y del cnidario *Renilla reniformis* (Summers and Leib, 2002). La enzima luciferasa cuando reacciona con su sustrato, la D-luciferina, en presencia de oxígeno, de iones magnesio y de energía en forma de ATP, emite como resultado de la reacción luz de 560 nm de longitud de onda, la cual puede ser detectada por una cámara (figura R.1.). Para que se produzca esta reacción de oxidación el virus tiene que encontrarse en estado replicativo, traduciendo sus genes en proteínas (entre ellos la luciferasa) en el interior de la célula infectada. La detección diaria de la señal es posible debido a que la luciferasa no se acumula intracelularmente, ya que tiene una vida media de aproximadamente 3 horas (Thompson y cols., 1991). Asimismo, la D-luciferina es capaz de atravesar las membranas celulares y tanto la barrera hematoencefálica (Berger y cols., 2008; Rehemtulla y cols., 2000) como la placentaria (Lipshutz y cols., 2001), por lo que se distribuye por todo el organismo sin llegar a acumularse (Berger y cols., 2008; Contag y cols., 1997). Adicionalmente, se ha demostrado una baja toxicidad de esta molécula (Hardy y cols., 2001).



Figura R.1. Esquema de la reacción de oxidación de la luciferina.

En la figura R.2., se muestra la distribución e intensidad de la señal luminosa durante la infección hematógica por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL en hembras CD-1 a lo largo de toda la cinética de infección realizada (de 0.8 a 7 dpi). Las imágenes muestran la intensidad de luz recogida por la cámara tras la inyección de la D-luciferina, en una escala de color (el rojo representa la máxima emisión de luz y el violeta la mínima) sobre una foto en blanco y negro del ratón evaluado. Así, se determinó la señal de luz obtenida para cada uno de los ratones bajo estudio de forma longitudinal, desde el primer punto temporal (0.8 dpi) hasta la desaparición total de la misma a 7 dpi. La máxima intensidad de la señal (máxima expresión de la luciferasa) se detectó a 0.8 dpi en la zona lumbar-dorsal de los ratones. Esta intensidad fue decayendo progresivamente durante los siguientes puntos temporales, hasta hacerse indetectable a 5.7 dpi. La señal luminosa se restringió durante toda la cinética a la región abdominal de los ratones, no detectándose señal en la cabeza en ningún punto temporal.

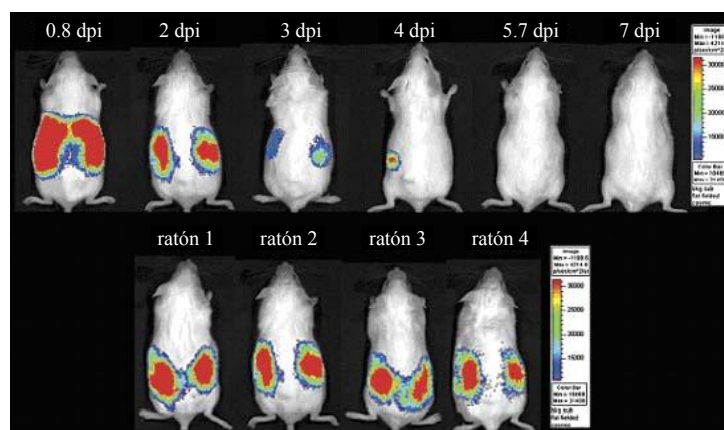


Figura R.2. Seguimiento de la cinética de infección hematógica por HSV-1 KOS/Dlux/oriL mediante bioluminiscencia. Cuatro hembras CD-1 de 9 semanas de edad fueron inoculadas ip con 2×10^7 ufp de HSV-1 KOS/Dlux/oriL. Se representa la señal de luz recogida por la cámara a 0.8, 2, 3, 4, 5.7 y 7 dpi tras la administración de la D-luciferina. Se muestran imágenes del ratón 2 en cada punto temporal (arriba). La variabilidad entre animales se representa mostrando los 4 ratones evaluados a día 2 post-infección (abajo). A la derecha se muestra la escala relativa de bioluminiscencia expresada en fotones por segundo por centímetro cuadrado y por estereorradián. El color rojo representa la máxima cantidad de emisión de luz y el violeta la mínima.

La alta reproducibilidad de la infección por este virus se demuestra en la figura R.2. (abajo), donde los 4 ratones usados para este estudio presentan una alta similitud de emisión de señal (región e intensidad) a día 2 post-infección. En todos los casos se aprecia como la señal proviene de la zona lumbar de los ratones. El análisis detallado de la figura R.3. muestra la imagen ventral de un ratón a día 3 post-infección. Se puede observar como la señal luminosa procede de regiones compatibles con las glándulas adrenales (flechas blancas) y con los ovarios (asteriscos).

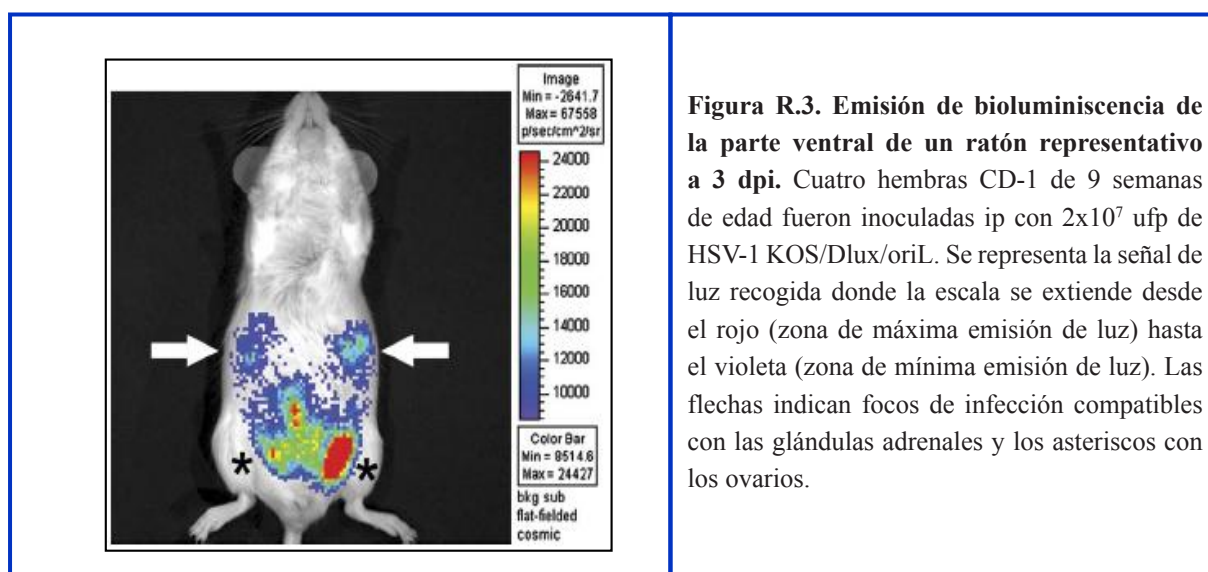
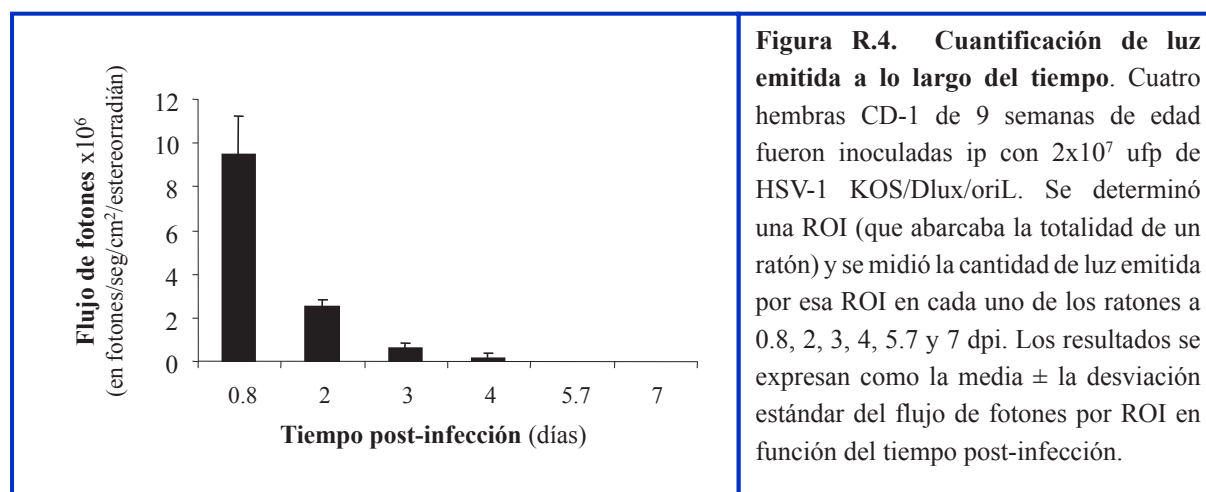


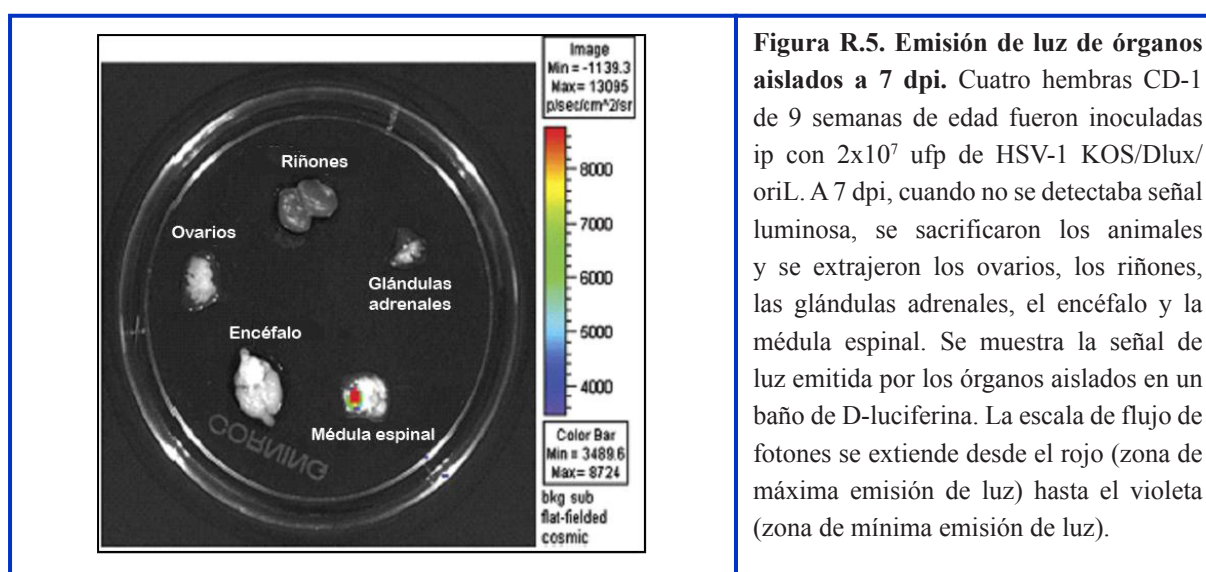
Figura R.3. Emisión de bioluminiscencia de la parte ventral de un ratón representativo a 3 dpi. Cuatro hembras CD-1 de 9 semanas de edad fueron inoculadas ip con 2×10^7 ufp de HSV-1 KOS/Dlux/oriL. Se representa la señal de luz recogida donde la escala se extiende desde el rojo (zona de máxima emisión de luz) hasta el violeta (zona de mínima emisión de luz). Las flechas indican focos de infección compatibles con las glándulas adrenales y los asteriscos con los ovarios.

En las figuras R.2. y R.3. se muestra una distribución del virus similar a la descrita previamente por Burgos y col. para la infección hematógena con la cepa KOS salvaje del HSV-1 (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002). Tras la inoculación ip, el virus accede al torrente sanguíneo colonizando tejidos preferenciales próximos al sitio de primoinfección: ovarios y glándulas adrenales. A partir de 5.7 dpi, se detecta la mayor cantidad de virus salvaje en el encéfalo (Burgos y cols., 2002), al contrario que lo observado en este estudio con el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL, lo que puede ser debido a un aclaramiento del virus, a una entrada en el SNC o al inicio de la latencia.

El sistema empleado para la detección de la señal luminosa permite realizar, además del estudio cualitativo, un estudio cuantitativo de la señal obtenida, lo que permite trazar la infección sin necesidad de sacrificar a los animales. De esta manera, se evita cualquier tipo de sesgo anatómico y la posible exclusión de sitios inesperados de infección. En la figura R.4., se representa la intensidad luminosa de la totalidad del ratón en función del tiempo post-infección.



A 7 dpi, cuando la señal luminosa fue indetectable en el ratón vivo, se procedió al sacrificio humanitario de los animales y al análisis de los órganos aislados. Para ello, se diseccionaron los órganos inmediatamente tras la medida de señal *in vivo* y se sumergieron en un baño de D-luciferina. La figura R.5. muestra la señal de luz proveniente de los órganos aislados de un ratón representativo. Se analizaron los riñones, los ovarios, las glándulas adrenales, el encéfalo y la médula espinal, siendo detectable la señal únicamente en esta última.



Este resultado, unido a los obtenidos *in vivo*, confirma la similitud de esta infección con la descrita previamente por Burgos y col., para la cepa salvaje del virus (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002). En esos trabajos previos, se detecta por PCR cuantitativa la presencia del virus en la fase plasmática de la sangre tras la inoculación ip del virus. La bioluminiscencia *in vivo* aporta una aproximación experimental diferente ya que la detección del virus está

restringida a aquellos virus que estén traduciendo proteínas dentro de la célula. Tras la viremia, el virus salvaje coloniza los ovarios y las glándulas adrenales replicándose en estos órganos. La bioluminiscencia *in vivo* confirma estos resultados, ya que las regiones abdominales del ratón que presentan una mayor emisión de luz, son compatibles con las zonas anatómicas donde se encuentran los ovarios y las glándulas adrenales. Finalmente, el virus salvaje atraviesa la barrera hematoencefálica accediendo a los tejidos nerviosos, a través de las conexiones nerviosas de la glándula adrenal con la médula espinal (Gerendai y cols., 2002; Hill y cols., 1986). Con el virus KOS/Dlux/oriL la colonización de la médula espinal no se detectó en el animal vivo, pero sí en el ensayo de emisión de luz de los órganos aislados, lo que demuestra, aunque de forma residual, un acceso al SNC.

Estos resultados por tanto, permiten validar la técnica de la bioluminiscencia para el estudio de la infección hematógena por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones.

5.1.2. Seguimiento mediante PCR cuantitativa.

Con el objetivo de confirmar los resultados de la infección hematógena obtenidos por la bioluminiscencia *in vivo*, se replicó el mismo grupo de experimentos para el análisis por PCR cuantitativa. Para ello, se inocularon ip 32 ratones hembra CD-1 de 9 semanas de edad con 2×10^7 ufp del HSV-1 KOS/Dlux/oriL. A 0.8, 2, 3, 4, 5.7 y 7 dpi se procedió al sacrificio humanitario de los ratones y a la disección de sus órganos. Se estudió la progresión y la distribución del virus en dichos órganos mediante la técnica de la PCR cuantitativa, de manera análoga a los trabajos previos de Burgos y col. de infección de ratones C57BL/6 con las cepas KOS y F del HSV-1 (Burgos y cols., 2006a; Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002; Burgos y cols., 2006c).

El análisis de la carga de DNA viral en la sangre (figura R.6.) revela la presencia de genomas virales en cantidades constantes desde el primer punto tras la infección y durante toda la cinética (lo que indica una viremia constante). Estos resultados confirman estudios previos (Burgos y cols., 2002; Johnson, 1964; Lascano and Berria, 1980; Potratz y cols., 1986; Yirrell y cols., 1987), en los que se demuestra que la inoculación ip del HSV-1 en ratones produce una viremia inmediata debido al carácter hematógeno de este tipo de infección.

Los ovarios y las glándulas adrenales se han descrito como los principales órganos diana durante la infección hematógena (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002). Estos órganos, debido a la alta concentración de hormonas presentes, muestran una inmunosupresión local que es aprovechada por el virus para replicarse de manera altamente eficiente (Hill y cols., 1986; Wiegand y cols., 1991; Yirrell y cols., 1987). Por otra parte, estudios de varios autores (Burgos

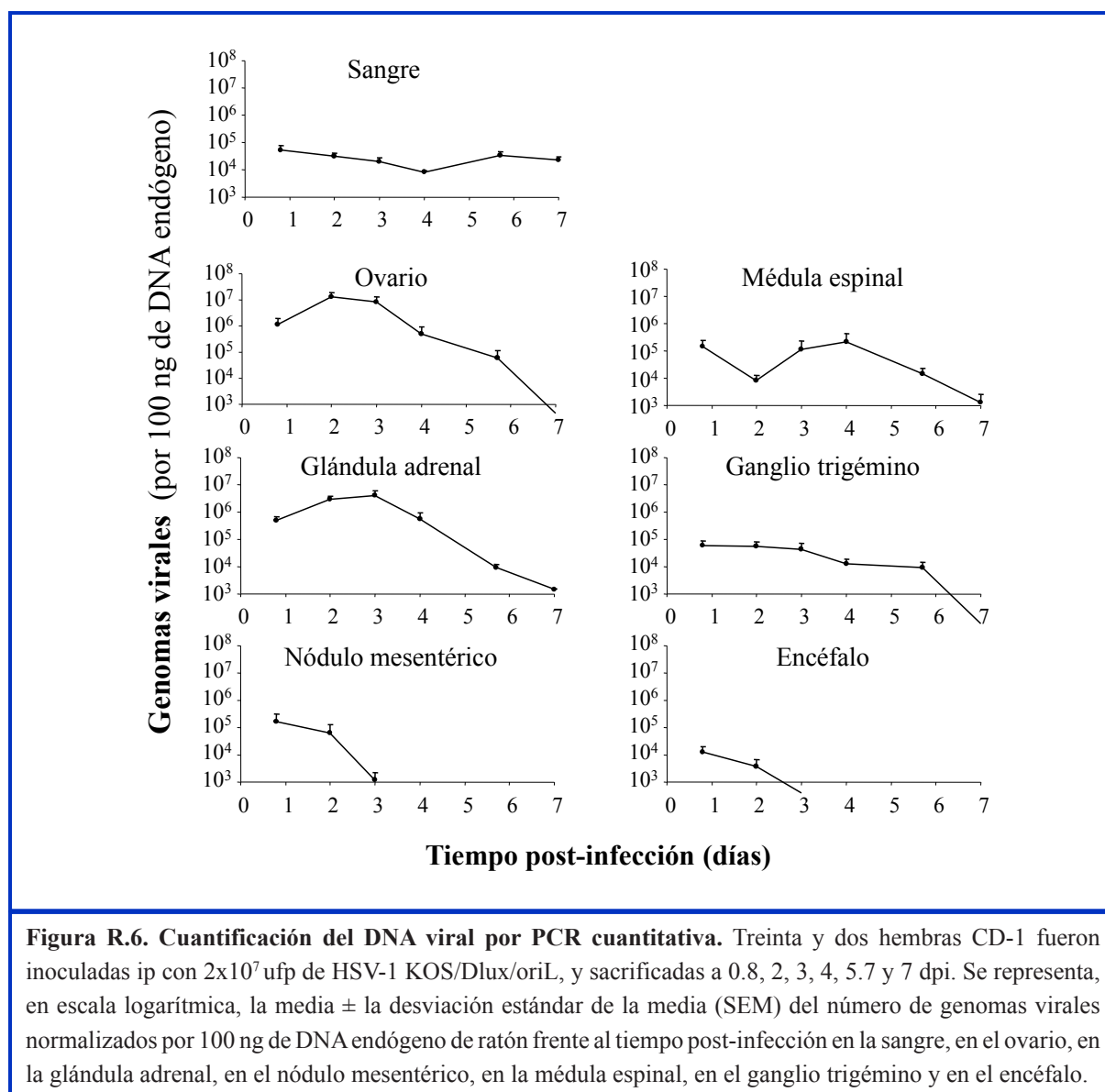
y cols., 2002; Hill y cols., 1986; Nachtigal and Caulfield, 1984; Potratz y cols., 1986) han demostrado la importancia de la glándula adrenal en la replicación y en la transmisión del HSV-1 desde la sangre a los tejidos del sistema nervioso, a través de sus conexiones nerviosas con la médula espinal (Buijs y cols., 1999; Gerendai and Halasz, 2000). En la gráfica de la figura R.6., se observa como los ovarios y las glándulas adrenales son los tejidos que presentan mayores cantidades de genomas virales de todos los órganos estudiados, confirmando los como órganos diana para la infección hematógena también para el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL. Además, las cinéticas de infección de estos órganos son similares. El DNA viral se detecta en cantidades crecientes desde el primer día post-infección en ambos órganos, presentando un máximo de DNA viral a 2 dpi para los ovarios y a 3 dpi para las glándulas adrenales. Para los dos órganos las cargas de DNA viral comienzan a descender a los 4 dpi, haciéndose indetectables a 7 dpi para los ovarios.

Los nódulos mesentéricos fueron analizados por su proximidad con el sitio de infección y por ser un tejido altamente infiltrado por poblaciones linfocitarias (Coles y cols., 2002). El análisis de este órgano revela bajos niveles de DNA viral a 0.8 dpi y un descenso de estos niveles hasta la desaparición total a 3 dpi, demostrando que no es un tejido de replicación preferencial de este virus (Jones y cols., 2000).

El análisis de otros órganos periféricos (hígado, bazo, corazón, médula ósea y páncreas) reveló cargas de DNA despreciables en estudios análogos de Burgos y col. (Burgos y cols., 2002), por lo que no fueron analizados en el presente trabajo.

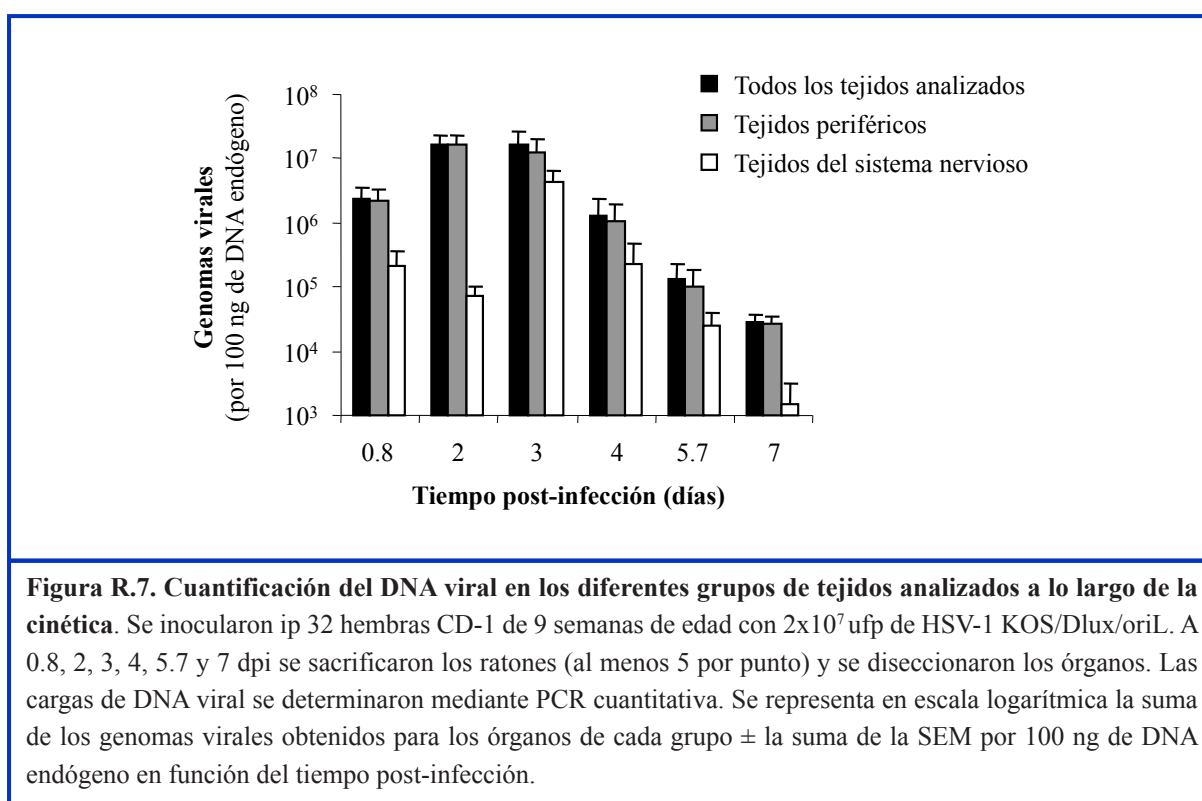
Debido al carácter neurotrópico del HSV-1, y en especial de la cepa KOS (Burgos y cols., 2002; Burgos y cols., 2006c), se analizaron diferentes regiones del sistema nervioso para comprobar si el HSV-1 KOS/Dlux/oriL mantiene este tropismo neural. Los resultados indicaron que las diferentes regiones del sistema nervioso analizadas (médula espinal, ganglios trigéminos y encéfalo) presentan cargas de DNA viral más bajas que los órganos periféricos (ovarios y glándulas adrenales), siendo la médula espinal la región del sistema nervioso con valores de DNA viral más altos. La médula espinal muestra DNA viral desde el primer punto post-infección, detectándose el máximo a 4 dpi, coincidiendo con el descenso de niveles de DNA viral en la glándula adrenal. Estos resultados confirman datos previos (Burgos y cols., 2002; Hill y cols., 1986), donde se muestra el acceso del virus desde la glándula adrenal a las neuronas de la columna intermediolateral de la médula espinal (Buijs y cols., 1999; Gerendai and Halasz, 2000). A partir de este punto temporal, los niveles de DNA viral descienden hasta hacerse prácticamente indetectables a la conclusión del estudio (7 dpi). El ganglio trigémino es uno de los principales reservorios de virus en los organismos infectados (Roizman, 1990)

por lo que también fue analizado en este estudio. En la presente cinética con el HSV-1 KOS/Dlux/oriL, los ganglios trigéminos presentan valores bajos y constantes de DNA viral, desde el primer día de análisis hasta 5.7 dpi, siendo indetectable el DNA viral a 7 dpi. El encéfalo es el órgano que presenta valores más bajos de DNA viral, siendo detectable el DNA del virus únicamente durante los dos primeros días de infección.



Los resultados obtenidos permiten concluir que la infección ip del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL mimetiza la infección hematogena. Además, se confirma que el ovario y la glándula adrenal son centros preferenciales de replicación del virus y vías de acceso del virus desde el torrente sanguíneo hasta el encéfalo a través de sus conexiones nerviosas con la médula espinal. Adicionalmente, los bajos niveles de DNA viral presentes en los tejidos nerviosos indican el carácter poco neuroinvasivo de este virus, corroborando los resultados previos que describen que la replicación del HSV-1 KOS/Dlux/oriL en el ganglio trigémino está atenuada hasta 10 veces con respecto al virus salvaje (Summers and Leib, 2002).

Una vez obtenidas las cargas de DNA viral mediante PCR cuantitativa, y con el objetivo de comparar estos resultados con los obtenidos mediante bioluminiscencia *in vivo*, se representaron los genomas virales detectados por PCR cuantitativa para los tejidos periféricos (la suma de los valores de DNA viral de la sangre, de los nódulos mesentéricos, de las glándulas adrenales y de los ovarios), para los tejidos nerviosos (la suma de los valores de DNA viral de la médula espinal, del ganglio trigémino y del encéfalo) y para el total de órganos estudiados (suma de tejidos periféricos y de tejidos nerviosos), en función del tiempo post-infección (figura R.7.).

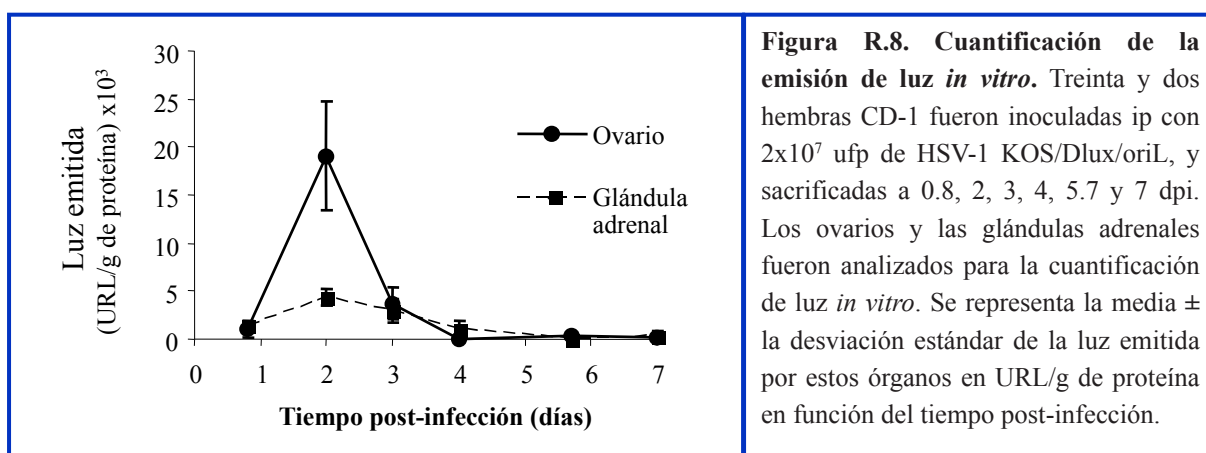


A la vista de esta figura, se observa como los órganos periféricos contribuyen de forma esencial a los valores totales de DNA del HSV-1 detectados en cada punto temporal, siendo marginal la contribución de los órganos del sistema nervioso. El perfil de esta figura es similar al de la figura R.4., que representa la media del flujo de fotones detectados por el sistema en función del tiempo post-infección. La principal diferencia está a 0.8 dpi, ya que la cantidad de virus detectada por bioluminiscencia es proporcionalmente más alta. Esta diferencia se puede explicar debido a que la bioluminiscencia detecta virus replicativo, mientras que la PCR cuantitativa detecta DNA viral (presente tanto en partículas virales replicativas como en defectivas, y tanto en el interior como en el exterior de las células). Por este motivo, el máximo de DNA viral por PCR cuantitativa se detecta a día 2 post-infección. Además, debido a la absorción de la piel y de los pigmentos presentes en los tejidos, la señal proveniente de regiones internas del ratón disminuye 10 veces por cada centímetro de tejido recorrido por la luz, disminuyendo así la señal total detectada por bioluminiscencia (Wu y cols., 2001). A pesar de todo ello, la correlación entre ambas técnicas es alta, permitiendo el uso combinado de las mismas para realizar estudios de infección con el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL.

5.1.3. Seguimiento mediante luminiscencia *in vitro*.

Para confirmar los resultados obtenidos anteriormente durante la infección por el HSV-1 KOS/Dlux/oriL, se realizó un análisis de luminiscencia *in vitro* en órganos seleccionados, estudiándose la emisión fotónica de los ovarios y de las glándulas adrenales de los ratones utilizados en el estudio por PCR cuantitativa.

La figura R.8. representa la emisión de luz para los ovarios y las glándulas adrenales a lo largo de la cinética de infección aguda. El máximo de intensidad se detectó a día 2 post-infección para ambos órganos, reduciéndose significativamente esta señal a 3 dpi, y haciéndose indetectable el resto de días analizados. Los ovarios presentaron mayores intensidades de luz, que se corresponden con niveles más altos de virus que las glándulas adrenales durante la cinética de infección, corroborando los resultados obtenidos por bioluminiscencia *in vivo* y por PCR cuantitativa.



Estos datos confirman que los resultados obtenidos por medida de DNA viral mediante PCR cuantitativa se correlacionan altamente con el flujo de fotones determinados por luminiscencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, para la infección hematológica por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL.

En resumen, estos experimentos han permitido caracterizar la cinética de infección hematológica del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones mediante tres técnicas: PCR cuantitativa, luminiscencia *in vitro* y bioluminiscencia *in vivo*. Estos resultados demuestran la validez de la técnica de la bioluminiscencia *in vivo* para el seguimiento de la infección por el HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones. Asimismo, ponen de manifiesto las limitaciones de este modelo de infección para la realización de estudios de neuroinvasión *in vivo*.

5.2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN HEMATÓGENA DEL HSV-1 KOS Y DEL HSV-1 KOS/Dlux/oriL EN DIFERENTES CEPAS DE RATONES.

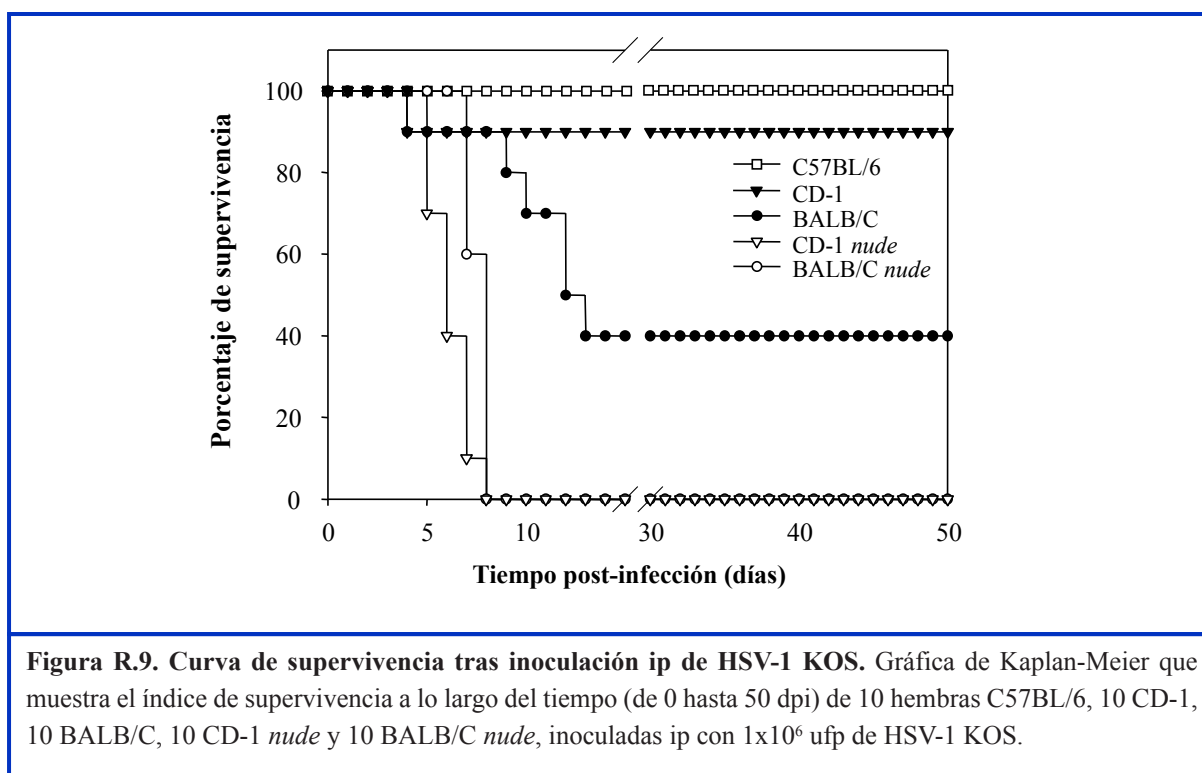
Con el objetivo de determinar la cepa de ratones más susceptible a la infección hematológica por el virus HSV-1, se realizó una comparación entre la eficiencia de infección con los virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL y HSV-1 KOS salvaje, utilizando tres cepas de ratones inmunocompetentes (C57BL/6, CD-1 y BALB/C) y dos cepas inmunosuprimidas (carentes de linfocitos T: CD-1 *nude* y BALB/C *nude*).

5.2.1. Eficiencia de la infección por HSV-1 KOS en diferentes cepas de ratones.

Para estudiar la eficiencia de infección por HSV-1 KOS en diferentes cepas de ratones (C57BL/6, CD-1 y BALB/C y de sus variantes inmunosuprimidas CD-1 *nude* y BALB/C

nude), y por tanto la influencia del sistema inmune en la infección, se inocularon ip una serie de ratones con 1×10^6 ufp del virus HSV-1 KOS. Posteriormente, se realizó un seguimiento de la sintomatología y de la supervivencia, que se representa en la figura R.9., durante los 50 primeros días tras la infección.

Los primeros signos de enfermedad aparecieron a 4 dpi para los ratones CD-1 inmunosuprimidos. Los síntomas observados fueron ausencia de interrelación social y cifosis. La enfermedad continuó con temblores generales e hipotermia. Además, los ratones presentaron falta de motricidad, siendo las extremidades posteriores las primeras en mostrar este síntoma. Finalmente, los ratones perdieron totalmente la capacidad motora cursando con la muerte del animal. La mortalidad de los ratones se produjo a diferentes tiempos según la cepa de ratón, en un rango que se extendió desde los 4 hasta los 13 dpi. Las cepas C57BL/6 y CD-1 fueron las más resistentes a la infección, puesto que todos los ratones C57BL/6 sobrevivieron a la conclusión del estudio (50 dpi) mientras que los ratones CD-1 presentaron un porcentaje de supervivencia del 90%. A su vez la cepa BALB/C se mostró moderadamente susceptible a la infección, ya que sólo el 40% de los ratones infectados sobrevivieron a la infección. Por otra parte, las dos cepas inmunosuprimidas CD-1 *nude* y BALB/C *nude* revelaron una alta susceptibilidad a la infección, ya que ninguno de los ratones infectados sobrevivió al experimento. De hecho, a partir del quinto día post-infección, el porcentaje de mortalidad de ambas cepas aumentó drásticamente hasta alcanzar al 100% de los ratones a día 8 post-infección.



Estos resultados permiten clasificar las cinco cepas de ratones estudiadas en tres categorías en relación con la resistencia mostrada a la infección por HSV-1: las cepas C57BL/6 y CD-1 son resistentes a la infección, la cepa BALB/C es moderadamente susceptible, y las cepas inmunosuprimidas CD-1 *nude* y BALB/C *nude* son altamente susceptibles a la infección.

5.2.2. Estudio comparativo de la infección hematógica de los virus HSV-1 KOS y HSV-1 KOS/Dlux/oriL en diferentes cepas de ratones.

Para comparar la eficiencia en la infección de los virus HSV-1 KOS y HSV-1 KOS/Dlux/oriL, y a su vez su eficiencia de infección en diversas cepas de ratones y correlacionarlos con los datos de susceptibilidad descritos en el apartado anterior, se inocularon con ambos virus ratones hembra C57BL/6, CD-1, BALB/C, CD-1 *nude* y BALB/C *nude*, y se estudiaron las cargas virales presentes en diferentes órganos durante la infección aguda a 5.7 dpi [(momento en que la carga de DNA viral en el encéfalo es máxima según resultados previos de nuestro laboratorio (Burgos y cols., 2002))].

El análisis de la carga viral en los ratones infectados con el virus HSV-1 KOS revela que la cepa inmunosuprimida CD-1 *nude* presenta las mayores cargas de DNA viral de todas las cepas estudiadas, independientemente del tejido analizado (figura R.10. y tabla R.1.). Además, dicha cepa presenta niveles de virus significativamente más altos ($p < 0.05$) que los ratones inmunocompetentes CD-1 (para todos los órganos estudiados). A su vez, los ratones inmunosuprimidos BALB/C *nude* muestran cargas significativamente más altas ($p < 0.05$) que los BALB/C inmunocompetentes en la sangre y en los tejidos periféricos (ovarios y glándulas adrenales), pero no en los tejidos nerviosos (médula espinal, encéfalo y ganglio trigémino). Estos resultados concuerdan con la mortalidad descrita en la figura R.8. para cada una de las cepas. Además, las cargas virales detectadas para la cepa C57BL/6 la sitúan en términos de susceptibilidad a la infección por este virus (HSV-1 KOS salvaje) entre las cepas inmunocompetentes CD-1 (más resistente) y BALB/C (más susceptible).

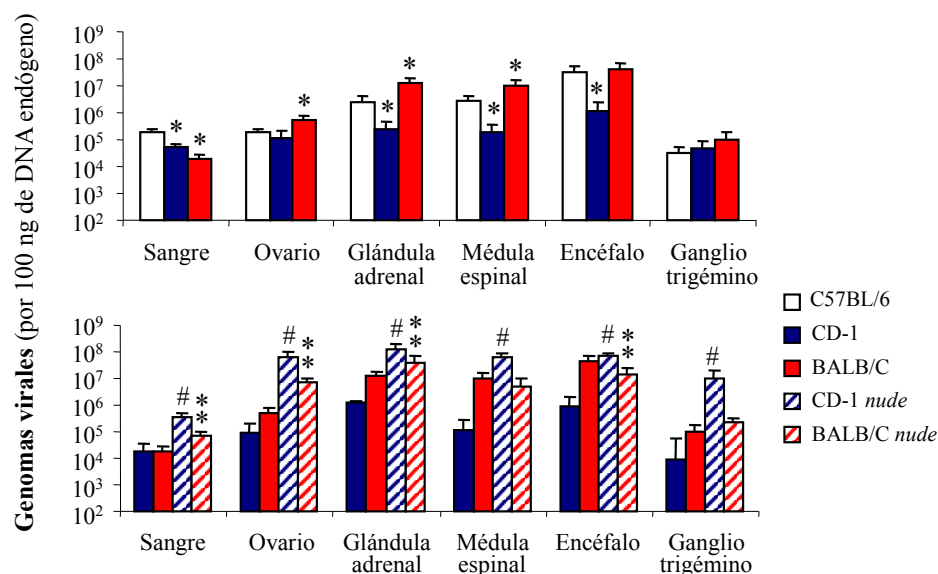
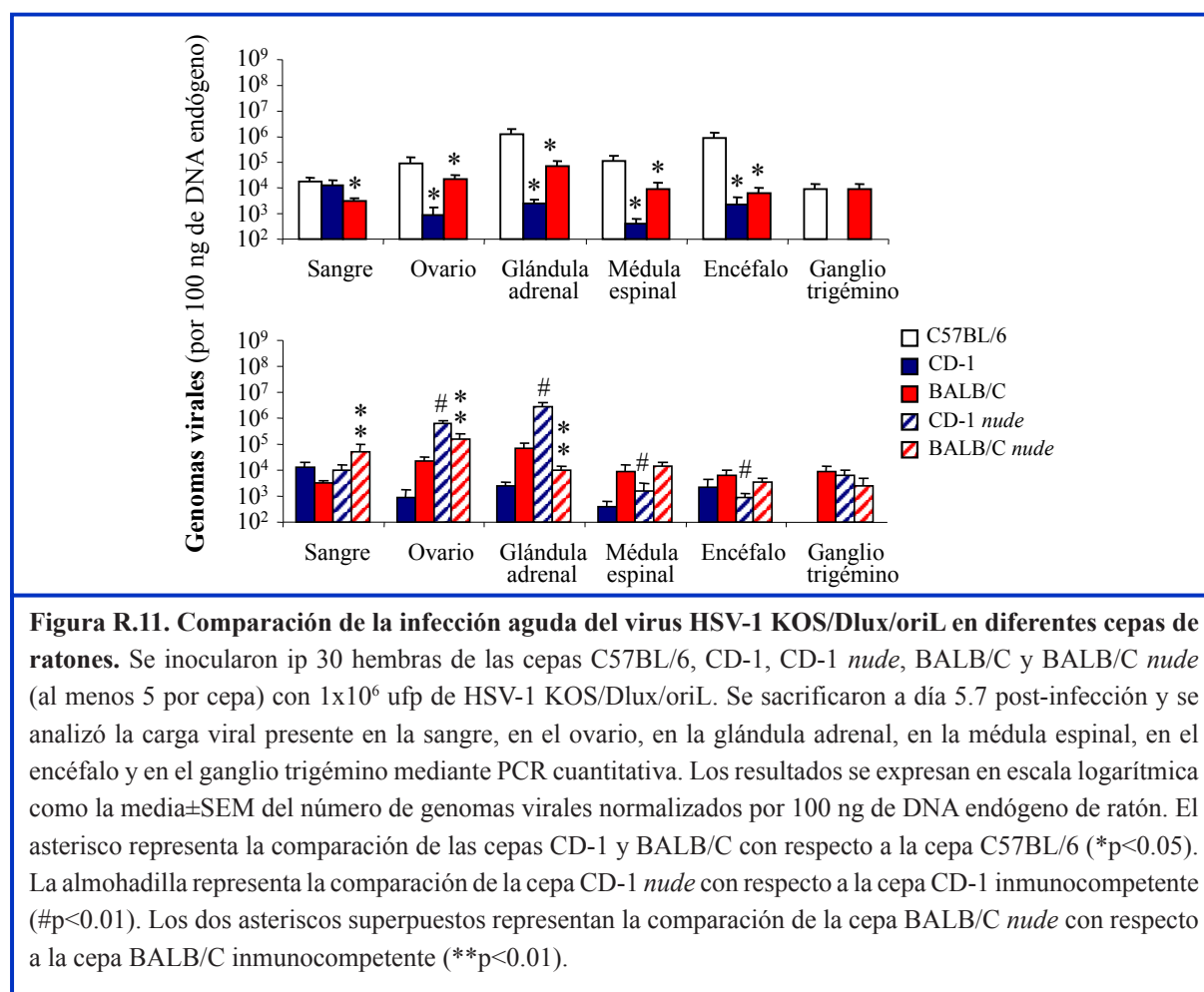


Figura R.10. Comparación de la infección aguda del virus HSV-1 KOS salvaje en diferentes cepas de ratones. Se inocularon ip 40 hembras de las cepas C57BL/6, CD-1, CD-1 *nude*, BALB/C y BALB/C *nude* (al menos 5 hembras por cepa) con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS salvaje. Se sacrificaron a día 5.7 post-infección y se analizó la carga viral presente en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino mediante PCR cuantitativa. Los resultados se expresan en escala logarítmica como la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón. Los genomas virales de los ratones C57BL/6 provienen de experimentos previos (Ramírez, 2006). El asterisco representa la comparación de las cepas CD-1 y BALB/C con respecto a la cepa C57BL/6 (* $p < 0.05$). La almohadilla representa la comparación de la cepa CD-1 *nude* con respecto a la cepa CD-1 inmunocompetente (# $p < 0.01$). Los dos asteriscos superpuestos representan la comparación de la cepa BALB/C *nude* con respecto a la cepa BALB/C inmunocompetente (** $p < 0.01$).

Genomas virales HSV-1 KOS salvaje (por 100 ng de DNA endógeno)					
	C57BL/6	CD-1	BALB/C	CD-1 <i>nude</i>	BALB/C <i>nude</i>
Sangre	190×10^3	51×10^3	17×10^3	365×10^3	69×10^3
Ovario	185×10^3	118×10^3	512×10^3	$63\,957 \times 10^3$	$6\,842 \times 10^3$
Glándula adrenal	$2\,591 \times 10^3$	234×10^3	$12\,994 \times 10^3$	$130\,577 \times 10^3$	$40\,983 \times 10^3$
Médula espinal	$2\,738 \times 10^3$	188×10^3	$9\,522 \times 10^3$	$62\,726 \times 10^3$	$4\,770 \times 10^3$
Encéfalo	$32\,235 \times 10^3$	$1\,190 \times 10^3$	$42\,788 \times 10^3$	$71\,297 \times 10^3$	$14\,172 \times 10^3$
Ganglio trigémino	32×10^3	44×10^3	98×10^3	$10\,080 \times 10^3$	220×10^3

Tabla R.1. Genomas virales detectados en tejidos de diferentes cepas de ratones inoculados con HSV-1 KOS salvaje. Se inocularon ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS 40 hembras (al menos 5 animales/cepa) de las siguientes cepas de ratones: C57BL/6, CD-1, BALB/C, CD-1 *nude* y BALB/C *nude*, y se determinó a 5.7 dpi la carga de DNA viral mediante PCR cuantitativa en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino.

El análisis de los órganos periféricos de los animales inoculados con el HSV-1 KOS/Dlux/oriL indica que los ratones inmunosuprimidos CD-1 *nude* siguen siendo los animales más susceptibles a la infección también con este virus (figura R.11. y tabla R.2.). Cuando se comparan estos resultados con las cargas de DNA viral de los CD-1 inmunocompetentes, se observa que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para todos los órganos analizados excepto para la sangre y para el encéfalo. Al igual que ocurre con el virus HSV-1 KOS, los ratones BALB/C *nude* muestran cargas virales significativamente más altas que los BALB/C inmunocompetentes en los órganos periféricos (sangre y ovario), pero no en la glándula adrenal ni tampoco en el sistema nervioso ($p > 0.05$). Los órganos de los ratones C57BL/6 presentan niveles virales intermedios con respecto a los órganos de los ratones inmunocompetentes (CD-1 y BALB/C) y a los órganos de los ratones inmunosuprimidos (CD-1 *nude* y BALB/C *nude*) en los tejidos periféricos (sangre, ovario y glándula adrenal). Además, las hembras C57BL/6 presentan las cargas de DNA de HSV-1 KOS/Dlux/oriL más altas en el encéfalo y en la médula espinal de todas las cepas de ratones estudiados.



Genomas virales HSV-1 KOS/Dlux/oriL (por 100 ng de DNA endógeno)					
	C57BL/6	CD-1	BALB/C	CD-1 <i>nude</i>	BALB/C <i>nude</i>
Sangre	17x10 ³	12x10 ³	3x10 ³	10x10 ³	51x10 ³
Ovario	90x10 ³	0.9x10 ³	21x10 ³	630x10 ³	154x10 ³
Glándula adrenal	1 263x10 ³	2x10 ³	70x10 ³	2 734x10 ³	9x10 ³
Médula espinal	108x10 ³	0.4x10 ³	8x10 ³	2x10 ³	14x10 ³
Encéfalo	895x10 ³	2x10 ³	6x10 ³	0.8x10 ³	3x10 ³
Ganglio trigémino	9x10 ³	0	9x10 ³	6x10 ³	2x10 ³

Tabla R.2. Genomas virales detectados en tejidos de diferentes cepas de ratones inoculados con HSV-1 KOS/Dlux/oriL. Se inocularon ip con 1x10⁶ ufp de HSV-1 KOS/Dlux/oriL 30 hembras (al menos 5 animales/cepa) de las siguientes cepas de ratones: C57BL/6, CD-1, BALB/C, CD-1 *nude* y BALB/C *nude*, y se determinó a 5.7 dpi la carga de DNA viral presente en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino.

Al comparar las cargas de DNA viral presentes en los tejidos de los ratones inoculados con ambos virus, se observa que dichas cargas son significativamente menores para los ratones inoculados con el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL. La tabla R.3. muestra la relación de las cargas virales detectadas en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino de cada una de las cepas de ratones tras la infección con HSV-1 KOS y HSV-1 KOS/Dlux/oriL. En dicha tabla se observa que el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL es menos infectivo que el HSV-1 KOS y especialmente menos neuroinvasivo, independientemente de la cepa de ratón estudiada.

Relación de las cargas virales de HSV-1 KOS respecto de las cargas virales de HSV-1 KOS/Dlux/oriL durante la infección aguda					
	C57BL/6	CD-1	BALB/C	CD-1 <i>nude</i>	BALB/C <i>nude</i>
Sangre	11	4	6	35	1
Ovario	2	130	24	101	44
Glándula adrenal	2	95	184	48	4315
Médula espinal	25	495	1110	39683	321
Encéfalo	36	524	7135	84479	4203
Ganglio trigémino	3	-	11	524	89

Tabla R.3. Relación de las cargas virales de HSV-1 KOS respecto de las cargas virales de HSV-1 KOS/Dlux/oriL durante la infección aguda. Se muestra la relación de los genomas virales detectados en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino de HSV-1 KOS respecto a los de HSV-1 KOS/Dlux/oriL durante la infección aguda en los ratones C57BL/6, CD-1, BALB/C, CD-1 *nude* y BALB/C *nude*.

Los resultados presentados en este apartado indican que el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL es significativamente menos infectivo y menos neuroinvasivo que el HSV-1 KOS. Además, muestran a la cepa CD-1 *nude* como la más susceptible a la infección por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL, aunque revelan también la necesidad de incrementar los niveles de virus en el sistema nervioso para realizar estudios de infección mediante bioluminiscencia *in vivo*. Estos resultados también destacan a la cepa C57BL/6 como la más susceptible a la neuroinfección por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL. Sin embargo, el hecho de que sea una cepa de pelaje negro impide que pueda ser usada en estudios de bioluminiscencia *in vivo*.

5.2.3. Efecto de la dosis de inoculación de HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos durante la fase aguda de la infección.

Para estudiar el efecto de la dosis de inoculación en la infección por el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL y tratar de incrementar los niveles de virus en el encéfalo de los ratones inmunosuprimidos CD-1 *nude*, se inocularon hembras de esta cepa con 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 ufp de HSV-1 KOS/Dlux/oriL, y se estudiaron las cargas virales presentes en los diferentes tejidos a 5.7 dpi.

La figura R.12. muestra las cargas virales detectadas en los diferentes órganos en función de la dosis de inoculación. Aquí se observa como los niveles de DNA viral detectados son directamente proporcionales a la dosis de inoculación, independientemente del órgano analizado. Para las tres dosis virales estudiadas el perfil de la infección en los distintos órganos fue similar, siendo los ovarios y las glándulas adrenales los tejidos que presentaban las mayores cargas virales. Asimismo, se observa que el ganglio trigémino es el órgano del sistema nervioso con mayores cargas de DNA viral a este tiempo. De forma general, se comprueba que las cargas virales presentes en los órganos de los animales inoculados con 1×10^5 ufp, son significativamente inferiores ($p < 0.01$) a las de los animales inoculados con 1×10^6 ufp, excepto para la sangre. A su vez, los niveles de DNA viral de los órganos de los ratones inoculados con 1×10^6 ufp son significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los ratones inoculados con 1×10^7 ufp, excepto para el encéfalo.

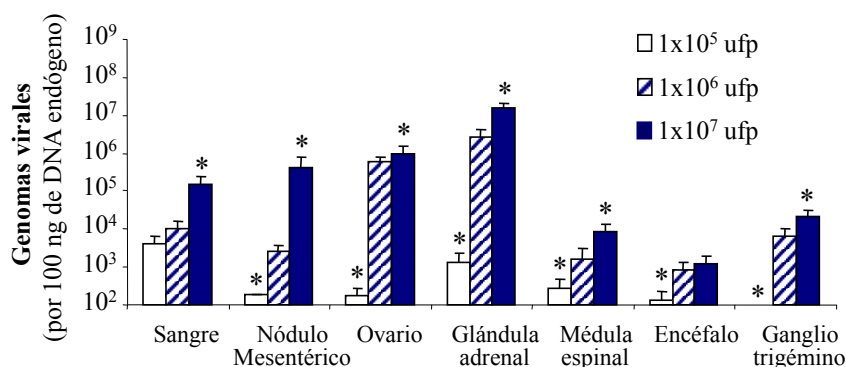


Figura R.12. Carga de DNA viral en función de la dosis inoculada en la infección aguda. Se inocularon ip 23 hembras de la cepa CD-1 *nude* con 3 dosis (1×10^5 , 1×10^6 ó 1×10^7 ufp) de HSV-1 KOS/Dlux/oriL (al menos 5 ratones por dosis). Los animales se sacrificaron a 5.7 dpi y se les extrajo la sangre, el nódulo mesentérico, el ovario, la glándula adrenal, la médula espinal, el encéfalo y el ganglio trigémino. Las barras representan, en escala logarítmica, la media \pm SEM de la carga viral expresada en copias de DNA viral normalizadas por 100 ng de DNA endógeno. Se comparan las cargas de DNA viral de los distintos órganos utilizando como referencia la cargas virales de los ratones inoculados con 1×10^6 ufp (* $p < 0.05$).

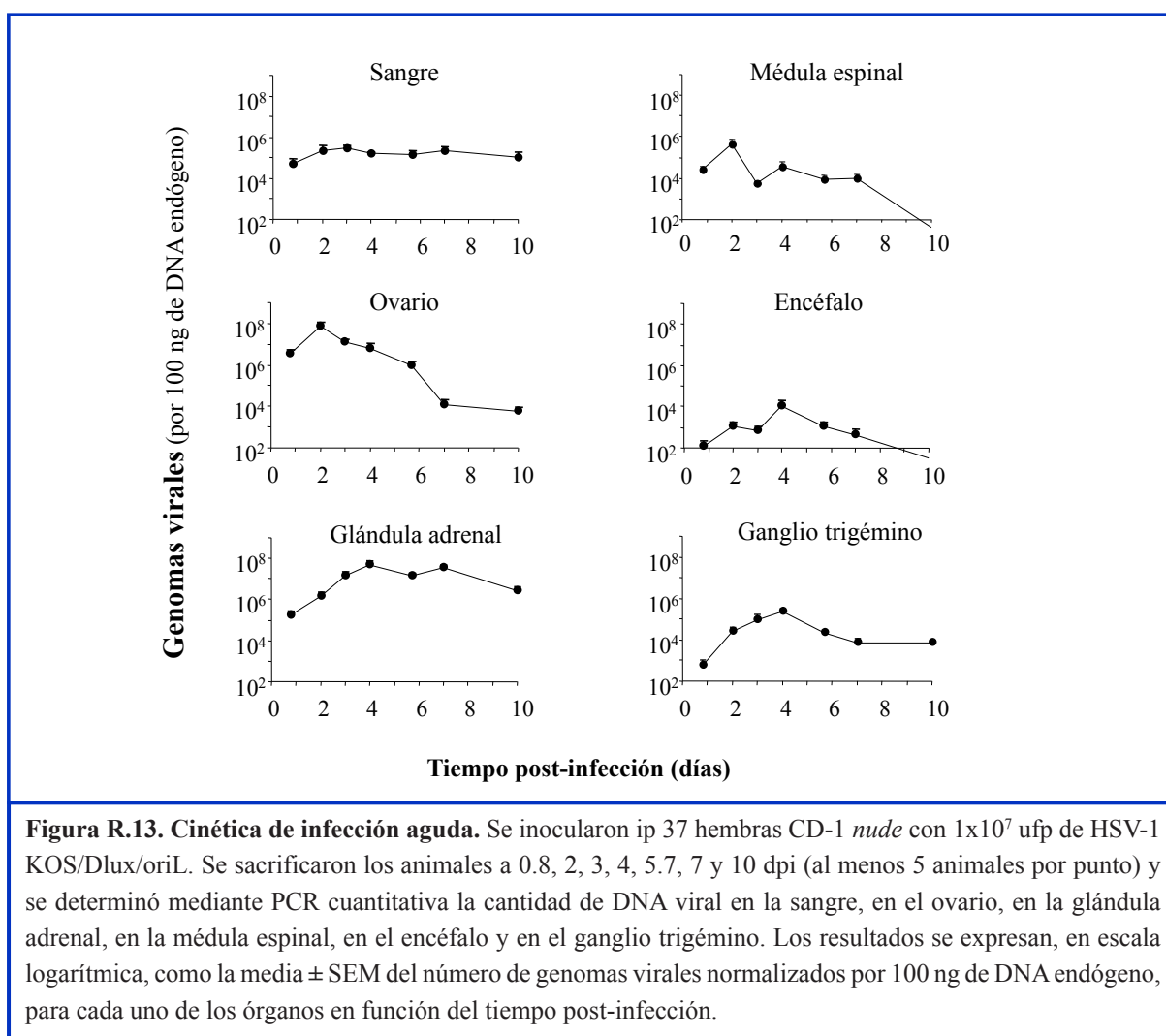
En resumen, los niveles de DNA viral de los diferentes órganos se incrementan con la dosis de inoculación, siendo la carga viral detectada dependiente de la dosis viral inoculada. Además, el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL se muestra poco neuroinvasivo para todas las dosis virales estudiadas, siendo el encéfalo el órgano con la menor presencia viral.

5.2.4. Cinética de la infección aguda del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos.

Con el objetivo de determinar la progresión y la distribución del HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 *nude* durante la infección por vía hematógica y valorar si este virus podía ser usado en estudios de bioluminiscencia *in vivo*, se inocularon hembras de dicha cepa con 1×10^7 ufp y se estudiaron las cargas virales presentes en los tejidos a lo largo de la cinética de infección aguda (de 0.8 hasta 10 dpi).

El análisis de la carga de DNA viral (figura R.13.) reveló una viremia constante a lo largo del tiempo. De forma general, se observa una progresión del virus similar a la obtenida durante la infección de la cepa CD-1 inmunocompetente con este mismo virus (comparar con figura R.6.). El ovario y la glándula adrenal fueron los tejidos que presentaron, nuevamente,

las mayores cargas de DNA viral de todos los órganos estudiados. La mayor carga de DNA viral en el ovario se detectó a día 2 post-infección, disminuyendo progresivamente los niveles virales hasta el día 6 post-infección. A 7 dpi se produjo un descenso brusco de dichos niveles, momento a partir del cual permanecieron estables hasta la conclusión del experimento. Por su parte, la glándula adrenal presentó DNA viral en cantidades crecientes desde 0.8 dpi, hasta alcanzar un máximo a 4 dpi. En los siguientes días estos niveles descendieron levemente. Tanto la médula espinal como el encéfalo presentaron cantidades de DNA viral menores que los tejidos periféricos. El máximo de carga viral se detectó a 2 dpi para el encéfalo y a 4 dpi para la médula espinal, no pudiéndose detectar el genoma del virus en ninguno de estos tejidos a 10 dpi. El ganglio trigémino fue el único tejido nervioso donde se detectó DNA viral a la conclusión del experimento (a 10 dpi), presentando un máximo a 4 dpi.



En este grupo de resultados, de nuevo, se demuestra que la progresión del HSV-1 KOS/Dlux/oriL (figuras R.6. y R.13.) es comparable a la descrita anteriormente para el virus HSV-1

KOS durante la infección hematogena en ratones C57BL/6 (Burgos y cols., 2002), resaltándose el escaso carácter neuroinvasivo del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL.

5.2.5. Efecto de la dosis de inoculación de HSV-1 KOS/Dlux/oriL en ratones CD-1 inmunosuprimidos durante la fase latente de la infección.

Para evaluar la influencia de la dosis administrada durante la infección latente del virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL, se inocularon hembras CD-1 *nude* con 1×10^5 y 1×10^6 ufp de dicho virus y se determinaron los niveles virales presentes en los distintos órganos a 37 dpi.

Según muestra la figura R.14., las cargas virales detectadas en los diferentes órganos presentan un patrón de infección similar para las dos dosis de inoculación, siendo la carga viral detectada directamente proporcional a la dosis viral inoculada. Los ratones inoculados con la mayor dosis viral presentaron mayores cargas virales, aunque sólo fue significativa esta diferencia para el ganglio trigémino. A diferencia de lo observado en la fase aguda, durante la fase latente los órganos que presentaron las mayores cargas virales fueron los órganos del sistema nervioso (médula espinal, encéfalo y ganglio trigémino), puesto que es en los tejidos nerviosos donde el virus establece de forma preferente la latencia (Roizman, 1996). Después del sistema nervioso, los mayores niveles de DNA viral se detectaron en la sangre. Estos resultados indican que el virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL es capaz de establecer latencia, a pesar de su carácter poco neuroinvasivo.

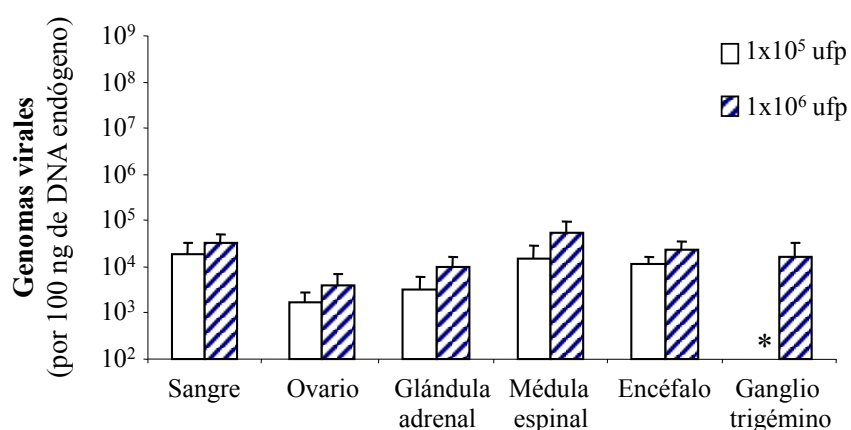


Figura R.14. Carga de DNA en función de la dosis inoculada en la infección latente. Se inocularon ip 15 hembras CD-1 *nude* con 1×10^5 y 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS/Dlux/oriL (al menos 5 ratones por dosis) y se sacrificaron a 37 dpi. Se representa, en escala logarítmica, la media \pm SEM de la cantidad de DNA viral normalizado por 100 ng de DNA endógeno de ratón en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino. Se comparan las cargas de DNA viral de los distintos órganos utilizando como referencia la cargas virales de los ratones inoculados con 1×10^6 ufp (* $p < 0.01$).

En resumen, los diferentes experimentos desarrollados en este capítulo descartan al virus HSV-1 KOS/Dlux/oriL para la realización de estudios de neurodegeneración, debido a su escaso tropismo neuronal. No obstante, se confirma como un modelo válido para la realización de ensayos de infección sistémicos *in vivo*, ya que este virus puede ser seguido mediante bioluminiscencia, como ha quedado reflejado en el capítulo 5.1.

A partir de aquí, y para estudiar la neurodegeneración asociada a la infección por HSV-1, se utilizó la cepa KOS de este virus por su mejor acceso al sistema nervioso en todas las cepas de ratones estudiadas, y la cepa de ratones C57BL/6 puesto que presenta niveles elevados de virus en el encéfalo a la vez que una baja mortalidad.

5.3. ESTUDIO DE LA NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A LA INFECCIÓN POR HSV-1.

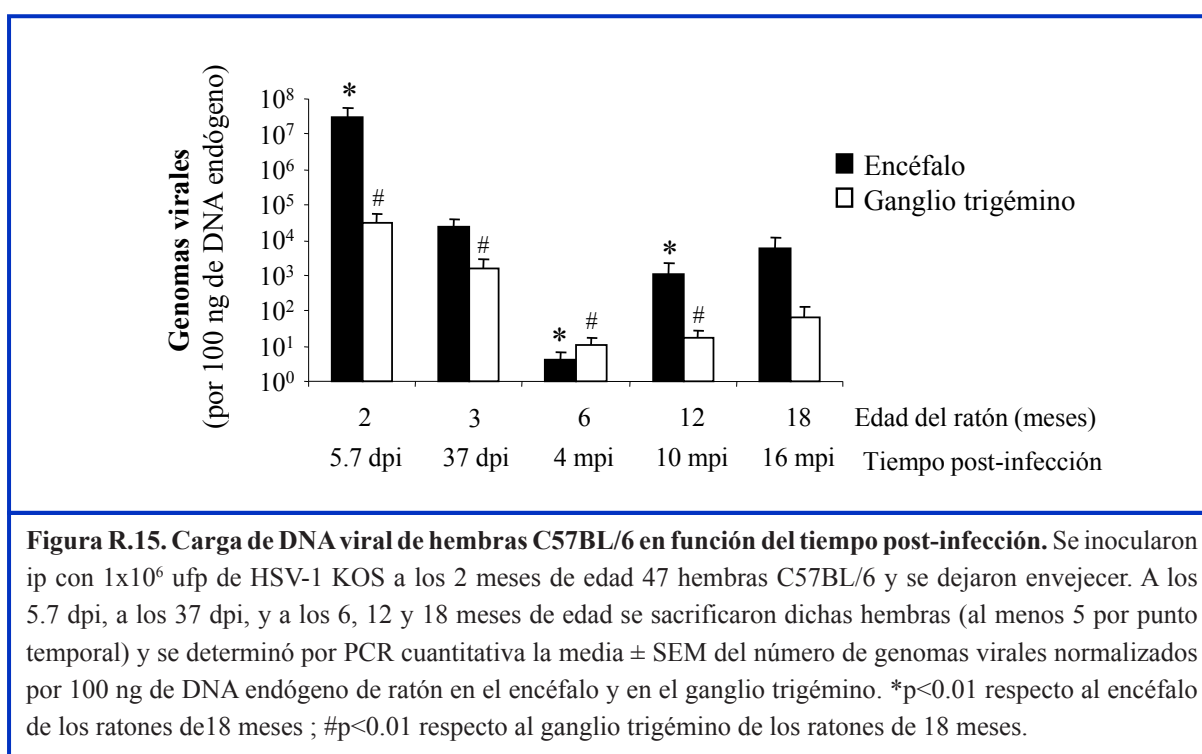
En el capítulo anterior, se ha establecido que la infección hematógena de ratones C57BL/6 con el virus HSV-1 KOS es el modelo más ventajoso para el estudio de la posible neurodegeneración asociada al HSV-1. Partiendo de estas condiciones generales, a continuación se analizó el efecto del género y de la presencia de *apoE* (ratones *apoE* *+/+* frente a ratones *apoE* *-/-*) en la neurodegeneración, debido a que son factores implicados en la EA (McDowell, 2001; Strittmatter and Roses, 1995). Por otra parte, en este capítulo se estudia el efecto de la dosis de inoculación, puesto que una mayor carga de virus en el encéfalo podría condicionar los fenómenos de la neurodegeneración. Adicionalmente, se ha realizado este mismo estudio en ratones *sod2* *+/-*, ya que estos ratones presentan una menor capacidad para la eliminación de aniones superóxido, lo que les confiere mayores cantidades de radicales libres y, por tanto, un mayor daño oxidativo, por lo que estos ratones se usan como modelo de envejecimiento acelerado (Kapahi y cols., 1999; Kokoszka y cols., 2001). En todos los casos, los ratones fueron inoculados ip con el virus a los 2 meses de edad y se dejaron envejecer. Se realizaron ensayos conductuales, de imagen, neuropatológicos y de determinación de las cargas virales a diferentes tiempos post-infección a lo largo de la vida del ratón: a 5.7 y a 37 dpi (2-3 meses de edad) y a 4, 7, 10 y 16 meses post-infección (mpi) (6, 9, 12 y 18 meses de edad respectivamente).

5.3.1. Determinación de la carga viral del HSV-1 con la edad.

Con el fin de estudiar la progresión de la infección a lo largo de la vida del ratón, se realizó un experimento con hembras C57BL/6 salvajes. Los animales fueron inoculados ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS a los 2 meses de edad. Posteriormente, a los 5.7 y 37 dpi, y a los 6, 12 y 18 meses de edad, se sacrificaron grupos de, al menos, 5 animales y se determinó por PCR

cuantitativa la carga viral presente en el encéfalo y en el ganglio trigémino.

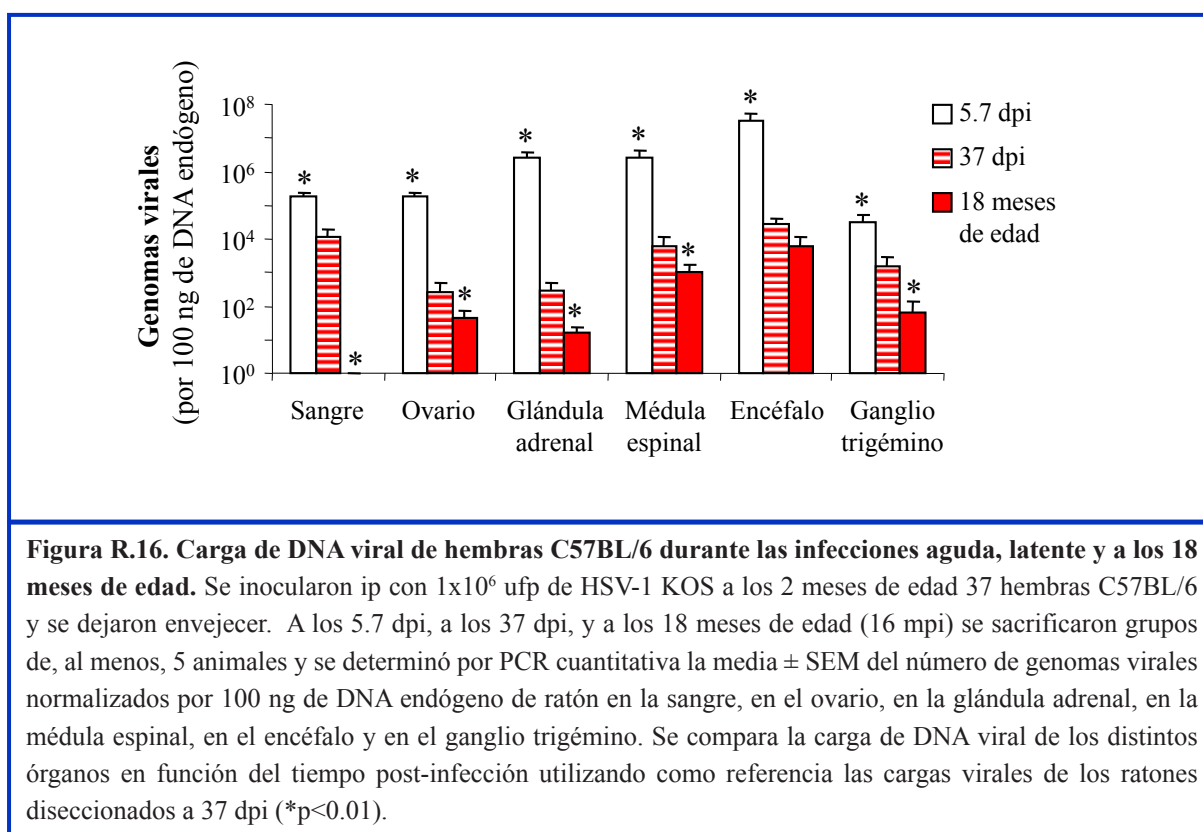
Las cargas virales detectadas mostraron un perfil de infección similar para el encéfalo y para el ganglio trigémino a lo largo del tiempo (figura R.15.). El encéfalo presentó mayor cantidad de DNA viral que el ganglio trigémino en todos los puntos analizados, excepto en los ratones de 6 meses de edad. La máxima cantidad de DNA de HSV-1 se detectó, para ambos órganos, durante la infección aguda [lo que coincide con estudios previos (Burgos y cols., 2002)]. A los 37 dpi, durante la fase de la latencia, se observó una disminución de los niveles de DNA viral en ambas regiones. En los ratones de 6 meses se detectó el mínimo de DNA viral de toda la cinética tanto para el encéfalo como para el ganglio trigémino. A partir de aquí, y coincidiendo con el envejecimiento de los animales, se detectó un incremento de las cargas virales presentes en el sistema nervioso de los ratones de 12 meses que aumentaron aún más a los 18 meses de edad. A este tiempo, las cargas virales en el encéfalo no fueron estadísticamente diferentes a las de los ratones de 3 meses infectados latentemente.



Estos resultados indican que existe una disminución progresiva de la carga viral, tanto en el encéfalo como en el ganglio trigémino, desde el punto de máxima detección viral a 5.7 dpi hasta los 6 meses de edad. Esta disminución de la carga viral puede ser consecuencia del efecto del sistema inmune del ratón en las primeras etapas de la vida. A partir de los 6 meses, y hasta los 18 meses se produce un incremento de los niveles virales, probablemente debido a un

declive del sistema inmune asociado al envejecimiento.

A la vista del incremento de la carga viral observada en el encéfalo de los ratones de 18 meses de edad, se realizó una comparación de forma detallada de las cargas virales presentes en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino de los ratones en tres momentos de la infección: durante la infección aguda a 5.7 dpi, durante la infección latente a 37 dpi y en los ratones envejecidos de 18 meses de edad. La figura R.16. muestra los resultados de esta comparación. En general, las cargas de DNA viral detectadas a 5.7 dpi para cada uno de los tejidos analizados son significativamente más altas ($p < 0.01$) que las detectadas a 37 dpi, siendo éstas a su vez significativamente mayores ($p < 0.01$) que las detectadas en los ratones de 18 meses, excepto para el encéfalo.



Los resultados mostrados en la figura R.16. indican que los tejidos nerviosos presentan perfiles de infección similares para los tres puntos temporales analizados, siendo el encéfalo el tejido con mayores niveles de DNA viral, lo que confirma el neurotropismo del HSV-1 y su capacidad de establecer latencia en este órgano. A 5.7 dpi la cantidad de genomas virales presentes en el encéfalo de los ratones es aproximadamente 1 000 veces mayor que a 37 dpi (ratio = 1 246). Sin embargo, la diferencia entre la carga viral detectada en el encéfalo a 37 dpi con respecto a las detectadas en los ratones de 18 meses es solamente 4 veces mayor (ratio

= 4.2). La médula espinal presenta cargas virales intermedias entre los niveles virales en el encéfalo y en el ganglio trigémino en los tres puntos temporales del estudio. Finalmente, el ganglio trigémino muestra las cargas virales más bajas de los tejidos del sistema nervioso.

El análisis de los tejidos periféricos muestra que la sangre presenta cargas de DNA viral elevadas tanto a 5.7 como a 37 dpi, no pudiendo detectarse DNA viral en la sangre de los ratones de 18 meses. Por otra parte, los ovarios y las glándulas adrenales revelan una disminución significativa de la carga viral detectada a 37 dpi con respecto a 5.7 dpi, indicando que durante la infección aguda el HSV-1 se replica fácilmente en estos tejidos, mientras que durante la infección latente la capacidad del virus para establecer latencia en ambos órganos se encuentra limitada, restringiéndose probablemente a las terminaciones nerviosas que los inervan desde la médula espinal (Buijs y cols., 1999; Gerendai y cols., 2002). Además, debido a que estos órganos se encuentran localmente inmunosuprimidos [debido a su alta concentración hormonal (Hill y cols., 1986; Wiegand y cols., 1991; Yirrell y cols., 1987)] las reactivaciones virales podrían estar favorecidas. Por último, en los ratones de 18 meses las cargas de DNA viral descienden aún más tanto en el ovario como en la glándula adrenal.

En resumen, las cargas de DNA viral presentes en los ratones varían a lo largo de la vida de los mismos, disminuyendo primero desde el momento de la máxima detección viral durante la primoinfección (debido probablemente al efecto del sistema inmune) y aumentando a continuación durante el envejecimiento. Además, los órganos del sistema nervioso son los que presentan las mayores cargas virales en los ratones de 18 meses, indicando el carácter neurotrópico del HSV-1 y su posible implicación en procesos neurodegenerativos.

5.3.2. Determinación de la carga viral en ratones infectados con HSV-1 y envejecidos de 18 meses de edad.

5.3.2.1. Efecto del género.

Para analizar el efecto del género en la carga viral presente en los ratones de 18 meses, se inocularon ip hembras y machos C57BL/6 de 2 meses de edad con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. Estos ratones se dejaron envejecer y a los 18 meses de edad fueron sacrificados y sus órganos diseccionados. Posteriormente, se determinaron por PCR cuantitativa los niveles de DNA viral presentes en los diferentes tejidos.

El análisis de las cargas virales mostró que las hembras presentaban cantidades de DNA viral mayores que los machos en todos los órganos estudiados (figura R.17.). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para las gónadas y, especialmente, para los tejidos del

sistema nervioso (médula espinal, encéfalo y ganglio trigémino). La glándula adrenal fue el tejido en el que se detectó la menor carga de DNA viral para las hembras, mientras que los testículos fue el órgano que mostró la menor carga viral en los machos. El análisis de la sangre reveló una ausencia de DNA de HSV-1 en ambos casos (hembras y machos), y que fue constante en todos los ratones de 18 meses estudiados, lo que sugiere que el virus se encuentra en estado de latencia y que no se liberan partículas virales al torrente sanguíneo. Al igual que ocurría en ratones jóvenes infectados en estado de latencia [figura R.15. y (Burgos y cols., 2005)], el encéfalo fue el órgano en el que se detectó la mayor concentración de DNA viral tanto para las hembras como para los machos, seguido de la médula espinal y del ganglio trigémino en el caso de las hembras, y tan sólo de la médula espinal en los machos. Estos tejidos preferenciales de infección concuerdan con los sitios preferenciales de establecimiento de latencia descritos por diversos autores (Baringer and Pisani, 1994; Roizman, 1996). Además, coincidiendo con estudios previos realizados a 37 dpi (Burgos y cols., 2005), el género femenino favorece la presencia de DNA viral en el encéfalo con el envejecimiento, ya que las cargas virales detectadas en este órgano fueron significativamente mayores en las hembras que en los machos.

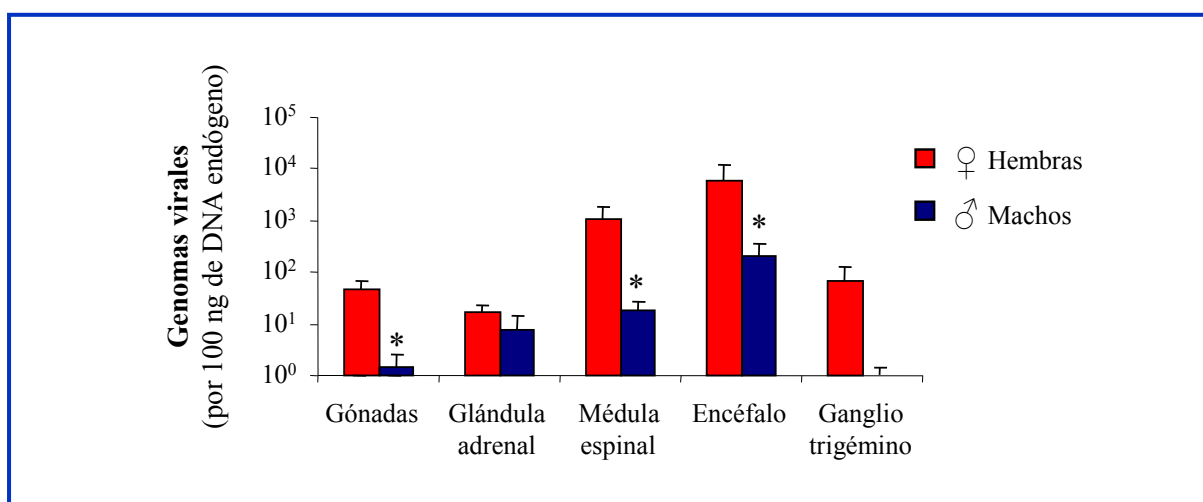
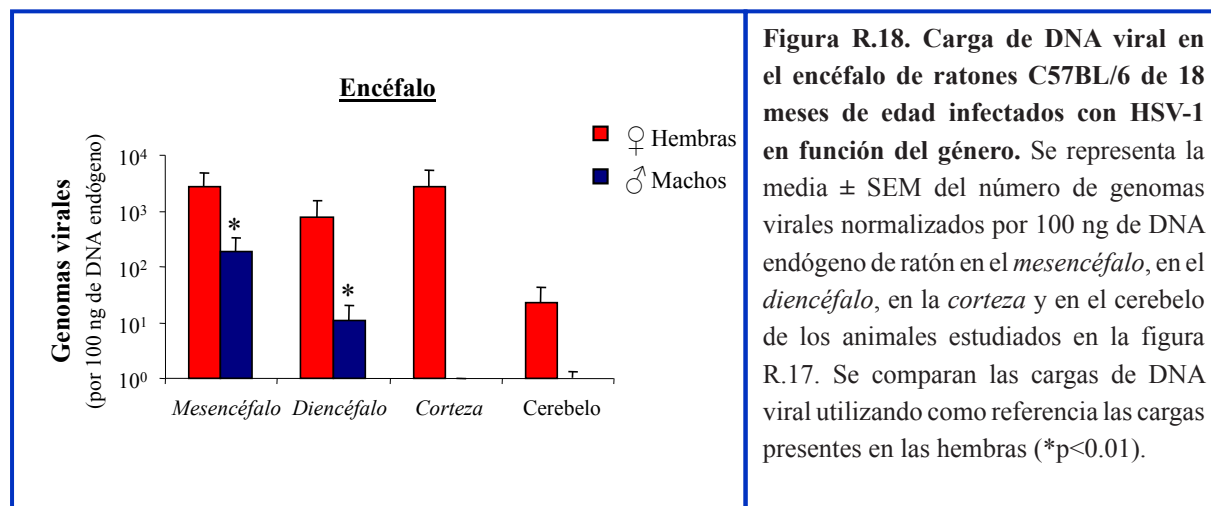


Figura R.17. Carga de DNA viral de ratones C57BL/6 de 18 meses de edad infectados con HSV-1 en función del género. Se inocularon ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS a los 2 meses de edad hembras y machos C57BL/6 y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad se sacrificaron 15 hembras y 11 machos y se determinó por PCR cuantitativa la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón en las gónadas, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino. Se comparan las cargas de DNA viral en los distintos órganos utilizando como referencia las cargas virales presentes en las hembras. (* $p < 0.01$).

El estudio detallado del encéfalo mostró concentraciones de DNA viral en las hembras significativamente mayores que en los machos, independientemente de la región encefálica estudiada (figura R.18.). Para las hembras, las regiones arbitrariamente denominadas como *corteza* y *mesencéfalo* fueron las que presentaron las mayores cargas de DNA viral, seguidas del

diencéfalo y del cerebelo. En los machos, sin embargo, fueron el *mesencéfalo* y el *diencéfalo* las regiones con mayores cargas de DNA viral, no pudiendo detectarse DNA viral ni en la *corteza*, ni en el cerebelo.



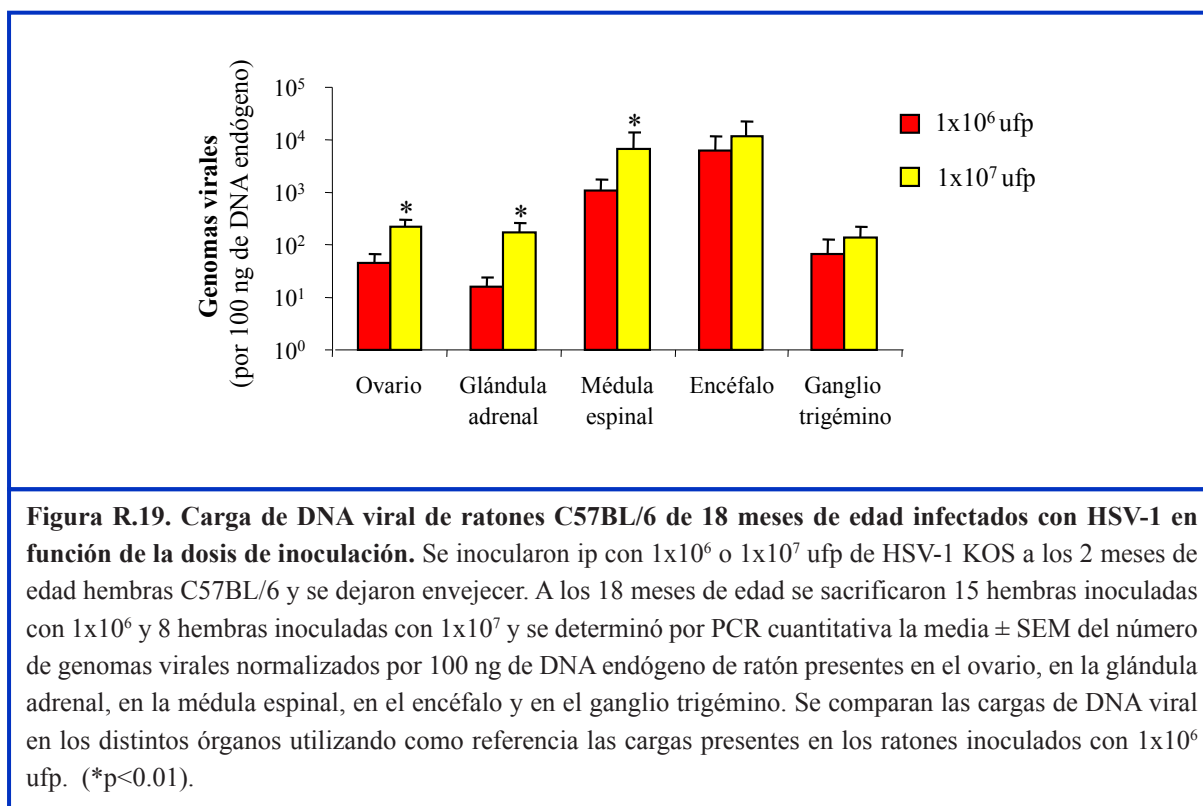
Los resultados presentados en este apartado muestran que las hembras envejecidas presentan cargas virales en el sistema nervioso significativamente mayores que los machos. Así pues, si el HSV-1 estuviera implicado en un proceso neurodegenerativo, el género femenino podría considerarse como un factor de riesgo en las patologías asociadas.

5.3.2.2. Efecto de la dosis de inoculación.

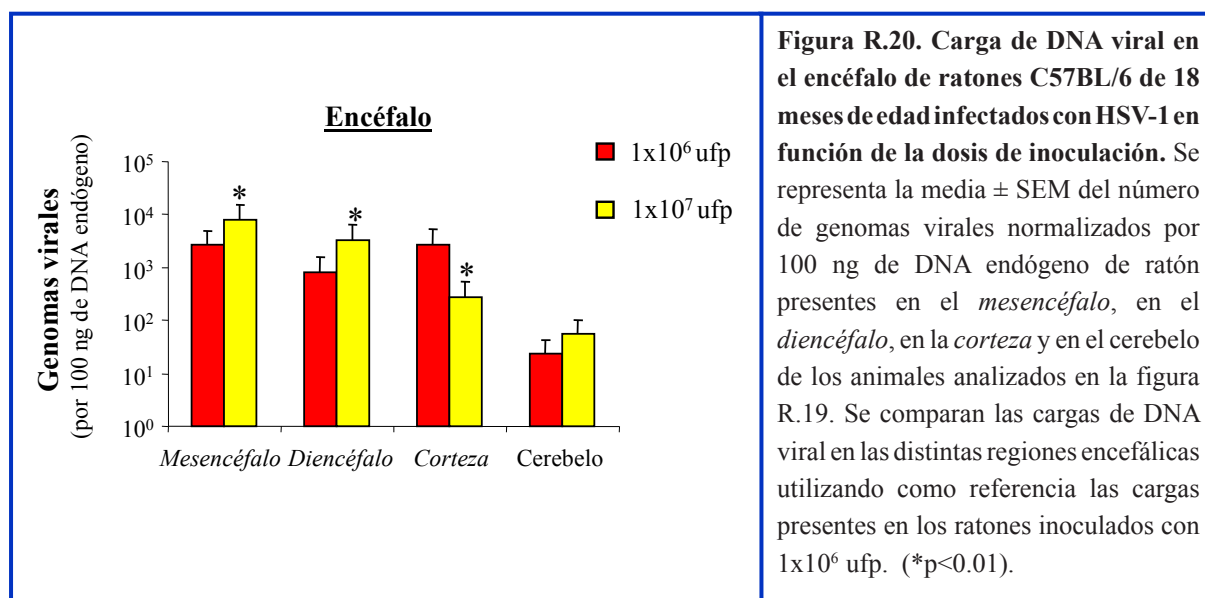
Adicionalmente, en este estudio se ha analizado la influencia de la dosis de inoculación en la carga viral de los animales a 18 meses. Para ello, se inocularon ip hembras C57BL/6 de 2 meses de edad con 1×10^6 ufp o 1×10^7 ufp de HSV-1 KOS y se dejaron envejecer, de igual manera que en experimentos anteriores.

Como se muestra en la figura R.19., los animales inoculados con 1×10^7 ufp presentaron cantidades de DNA de HSV-1 mayores que los ratones inoculados con 1×10^6 ufp, para todos los órganos analizados, aunque estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas para los ovarios, la glándula adrenal y la médula espinal (* $p < 0.01$). El perfil de infección fue muy similar para los animales infectados con ambas dosis virales. Los tejidos del sistema nervioso mostraron las cargas de DNA viral más altas de todos los tejidos analizados y, de ellos, el encéfalo fue el órgano que presentó la mayor carga viral, seguido de la médula espinal y del ganglio trigémino (por este orden y para las dos dosis virales utilizadas). Entre los órganos periféricos, los ovarios presentaron las cantidades de genomas más altas y la glándula adrenal las más bajas. Por último, no se detectó DNA viral en la sangre de ninguno de los animales, a

pesar de que aquí se utilizó una dosis viral 10 veces superior a la empleada en los experimentos anteriores.



El análisis de las diferentes regiones en las que se dividió el encéfalo (figura R.20.) reveló la misma tendencia observada en la figura anterior, es decir, las regiones pertenecientes a ratones inoculados con la dosis viral más alta (1x10⁷ ufp) presentaron cargas de DNA viral mayores que las de los ratones inoculados con la dosis viral más baja (1x10⁶ ufp). Esto fue así para el *mesencéfalo*, para el *diencéfalo* y para el cerebelo, pero no para la *corteza*. Para los animales inoculados con una dosis de 1x10⁷ ufp, el *mesencéfalo* fue la región que presentó la mayor cantidad de genomas virales, seguido del *diencéfalo*, de la *corteza* y por último del cerebelo. Por su parte en los ratones inoculados con una dosis viral de 1x10⁶ ufp, la *corteza* fue la región con mayor cantidad de genomas virales, seguida del *mesencéfalo*, del *diencéfalo* y del cerebelo.



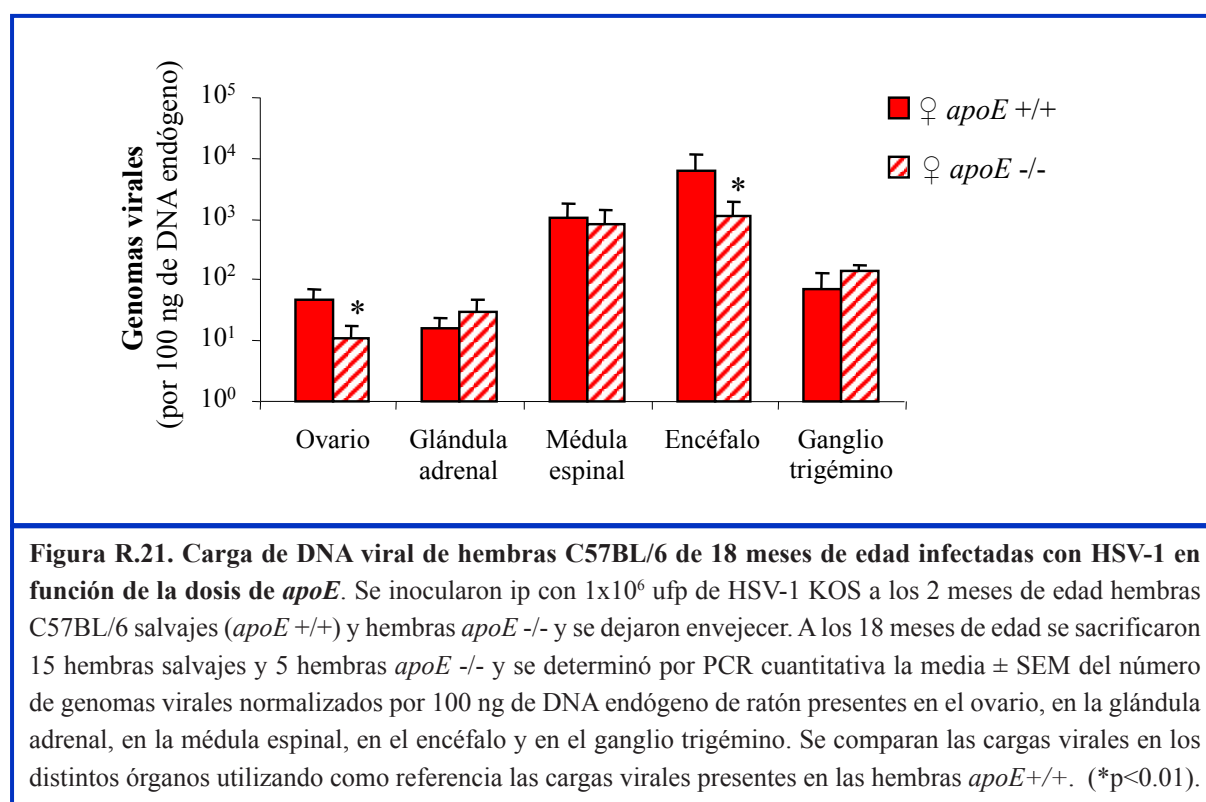
Estos resultados en ratones de 18 meses de edad, en conjunto, ponen de manifiesto que una vez que se ha establecido la latencia las cargas detectadas en el encéfalo son independientes de la dosis de inoculación, confirmando datos previos en ratones jóvenes (Burgos y cols., 2007). Así pues, si el HSV-1 estuviera relacionado con procesos neurodegenerativos, cuanto mayor fuese la carga viral presente en el encéfalo mayor debería ser el daño asociado.

5.3.2.3. Influencia del gen *apoE*.

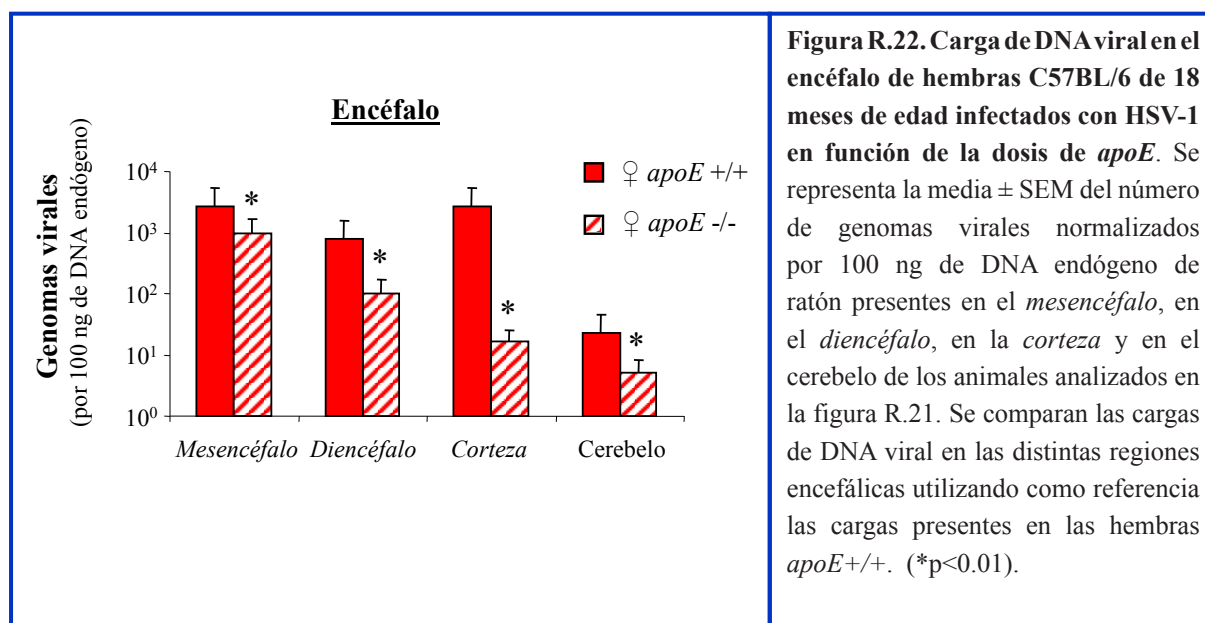
Estudios previos han demostrado la influencia del *APOE* humano y del *apoE* murino en el acceso del HSV-1 al SNC en modelos animales de infección aguda y latente (Burgos y cols., 2002; Burgos y cols., 2003; Burgos y cols., 2006b). Además, se ha descrito la similitud de la forma salvaje del apoE de ratón con la isoforma humana ApoE4 (Rajavashisth y cols., 1985), que es el principal factor de riesgo de padecer la EA (Strittmatter and Roses, 1995). Con el objetivo de estudiar la influencia del *apoE* en la infección por el HSV-1 en ratones envejecidos, se compararon las cargas virales presentes en los ratones salvajes (*apoE* +/+) y en los ratones deficientes en dicho gen (*apoE* -/-) de 18 meses que fueron infectados con HSV-1 a los 2 meses de edad. Este estudio se realizó en hembras y en machos.

El perfil de infección de las hembras de ambos fondos genéticos fue similar, tal y como refleja la figura R.21. Los órganos del sistema nervioso mostraron cargas virales más altas que los órganos periféricos, revelando la preferencia del HSV-1 de establecer latencia en tejidos nerviosos. El encéfalo fue el tejido que presentó los mayores niveles virales, seguido de la médula espinal y del ganglio trigémino para los dos fondos genéticos. Las hembras *apoE* +/+

presentaron cargas virales significativamente más altas ($p < 0.01$) que las *apoE* $-/-$ en el encéfalo (ratio = 5.6). En el resto de los órganos del SNC (médula espinal [ratio = 1.3] y ganglio trigémino [ratio = 0.5]), las diferencias en los niveles de DNA viral entre los dos fondos genéticos no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, las hembras *apoE* $+/+$ mostraron cargas virales estadísticamente diferentes en el ovario (ratio = 4.4) pero no en la glándula adrenal (ratio = 0.6), con respecto a las hembras *apoE* $-/-$. Como ya se ha descrito en apartados anteriores de este trabajo, no se detectó DNA viral en la sangre de ninguno de los ratones analizados.



Al estudiar las distintas regiones del encéfalo de forma independiente (figura R.22.), se observó que las hembras *apoE* $+/+$ presentaban cargas virales significativamente más altas ($p < 0.01$) que las *apoE* $-/-$ en todas y cada una de las regiones, reflejando la influencia del *apoE* en el acceso del HSV-1 al SNC. La *corteza* presentó la carga de DNA viral más alta en las hembras salvajes, seguida por el *mesencéfalo*, el *diencefalo* y el cerebelo. Por su parte, en los ratones *apoE* $-/-$ las mayores cargas de DNA viral se detectaron en el *mesencéfalo*, seguida del *diencefalo*, de la *corteza* y por último, al igual que las hembras salvajes, del cerebelo.



Para determinar si la dependencia de la carga viral del encéfalo con la dosis de *apoE*, es dependiente del género, se realizó la comparación de las cargas virales en machos salvajes y en machos deficientes en *apoE*, inoculados de la misma manera que las hembras. La figura R.23. muestra las cargas virales detectadas, donde se observa que el encéfalo de los machos, al igual que sucedía con el de las hembras, fue el tejido que presentó la mayor concentración de genomas virales de todos los órganos estudiados. Además, la carga viral del encéfalo de los ratones *apoE* +/+ fue mayor que la de los *apoE* -/-, aunque no de forma estadísticamente significativa. De nuevo, las cargas virales presentes en las regiones del sistema nervioso fueron mayores que las de los órganos periféricos, para los dos fondos genéticos. A diferencia de lo que sucedía con las hembras, los machos *apoE* -/- presentaron cargas de DNA viral más altas que los *apoE* +/+ en la médula espinal, pero estas diferencias tampoco fueron significativas. Por su parte, en el ganglio trigémino sólo se detectó DNA para los ratones *apoE* -/-. Finalmente, las glándulas adrenales y los testículos (en este orden) fueron los órganos que mostraron los menores niveles de DNA viral.

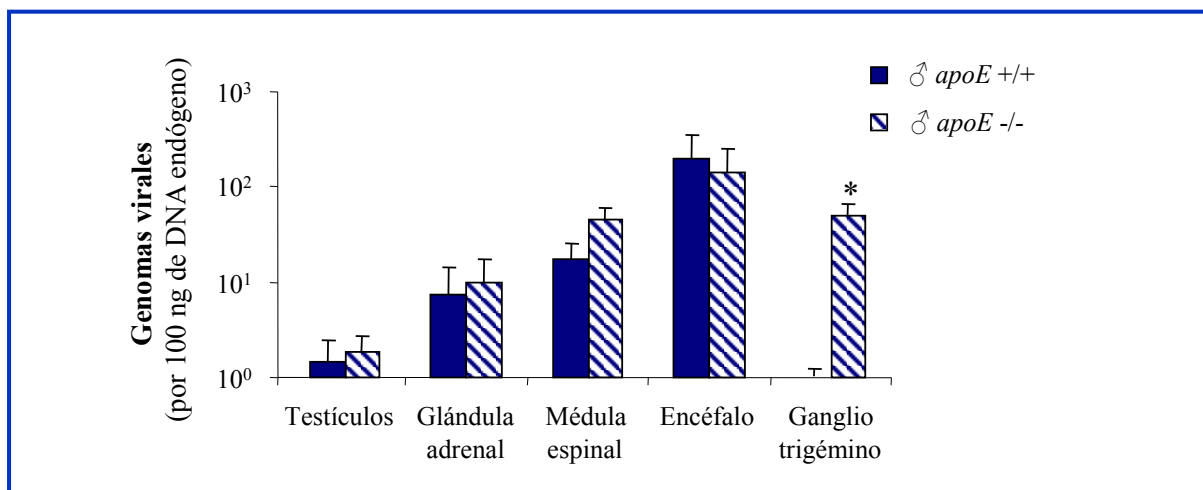


Figura R.23. Carga de DNA viral de machos C57BL/6 de 18 meses de edad infectados con HSV-1 en función de la dosis de *apoE*. Se inocularon ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS a los 2 meses de edad machos C57BL/6 salvajes (*apoE* $^{+/+}$) y *apoE* $^{-/-}$ y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad se sacrificaron 11 machos salvajes y 7 *apoE* $^{-/-}$ y se determinó por PCR cuantitativa la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón presentes en los testículos, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino. Se comparan las cargas de DNA viral en las distintos órganos utilizando como referencia las cargas presentes en los machos *apoE* $^{+/+}$. (* $p < 0.01$).

El análisis de las cargas virales presentes en las distintas regiones del encéfalo (figura R.24.), mostró al *mesencéfalo* como la región con mayor concentración de genomas virales en ambos fondos genéticos, seguida del *diencéfalo*, y en el caso de los ratones *apoE* $^{-/-}$, de la corteza y del cerebelo.

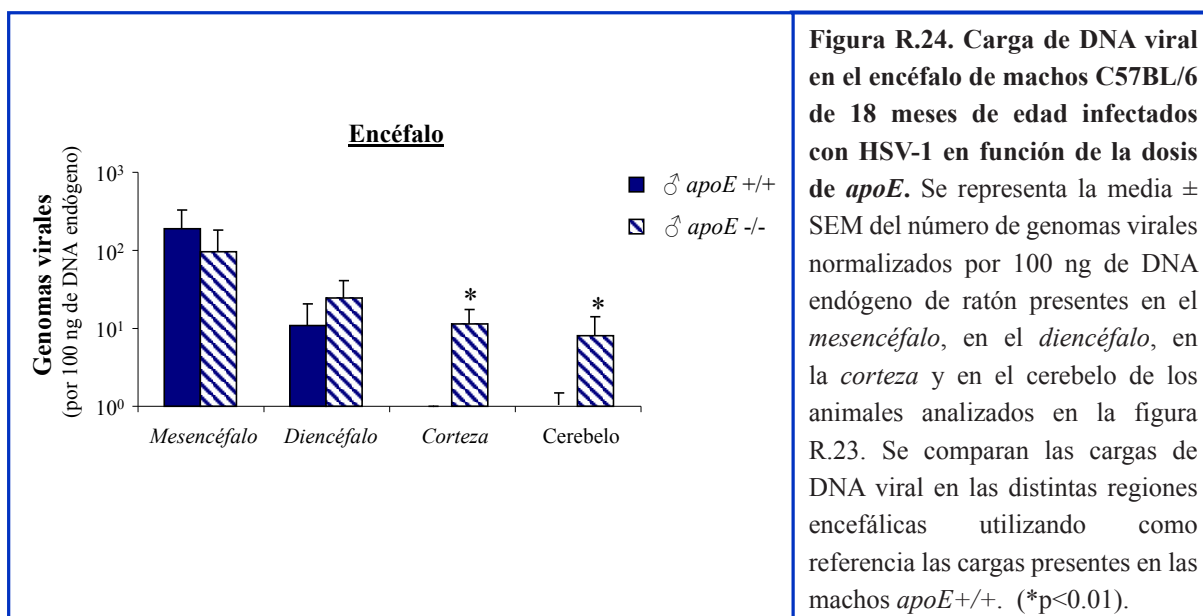
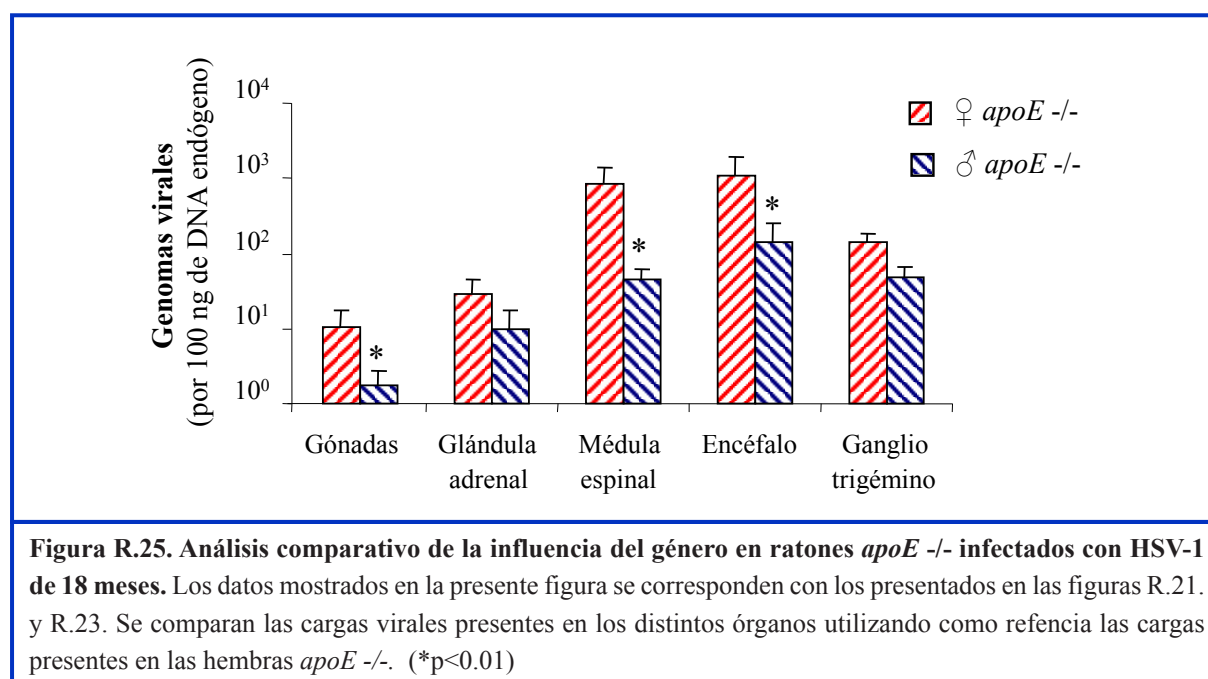


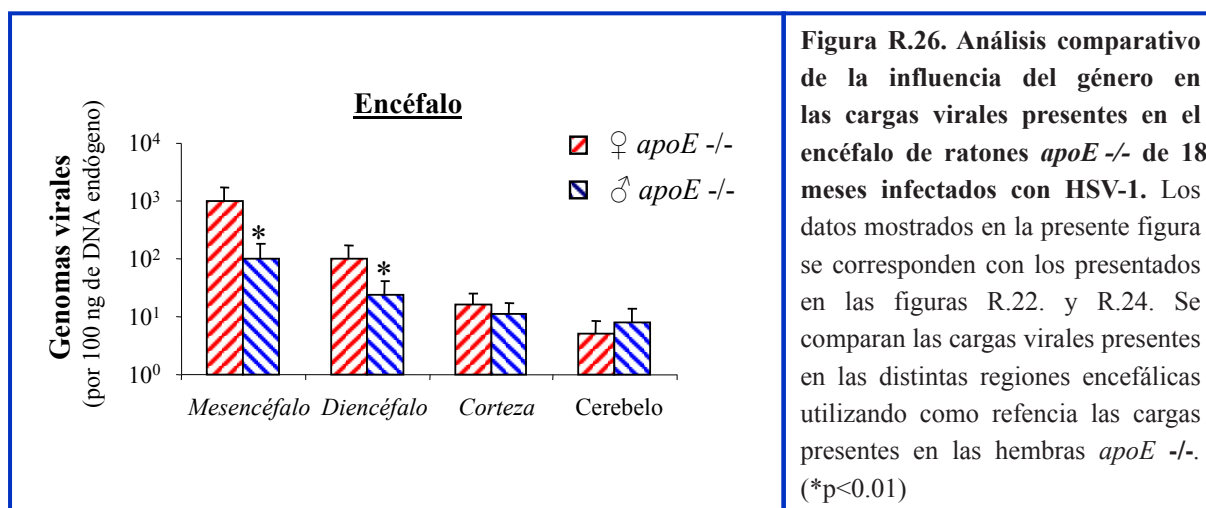
Figura R.24. Carga de DNA viral en el encéfalo de machos C57BL/6 de 18 meses de edad infectados con HSV-1 en función de la dosis de *apoE*. Se representa la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón presentes en el *mesencéfalo*, en el *diencéfalo*, en la *corteza* y en el *cerebelo* de los animales analizados en la figura R.23. Se comparan las cargas de DNA viral en las distintas regiones encefálicas utilizando como referencia las cargas presentes en los machos *apoE* $^{+/+}$. (* $p < 0.01$).

Los niveles de DNA viral detectados en los machos de 18 meses sugieren que la presencia del HSV-1 en el encéfalo de los ratones, junto con el envejecimiento, está favorecida para aquellos que poseen *apoE*, al igual que ocurría en las hembras. Es decir, el genotipo del *apoE* produce unas mayores cargas de HSV-1 en ambos géneros, aunque son las hembras *apoE* *+/+* las que presentan mayores niveles de virus.

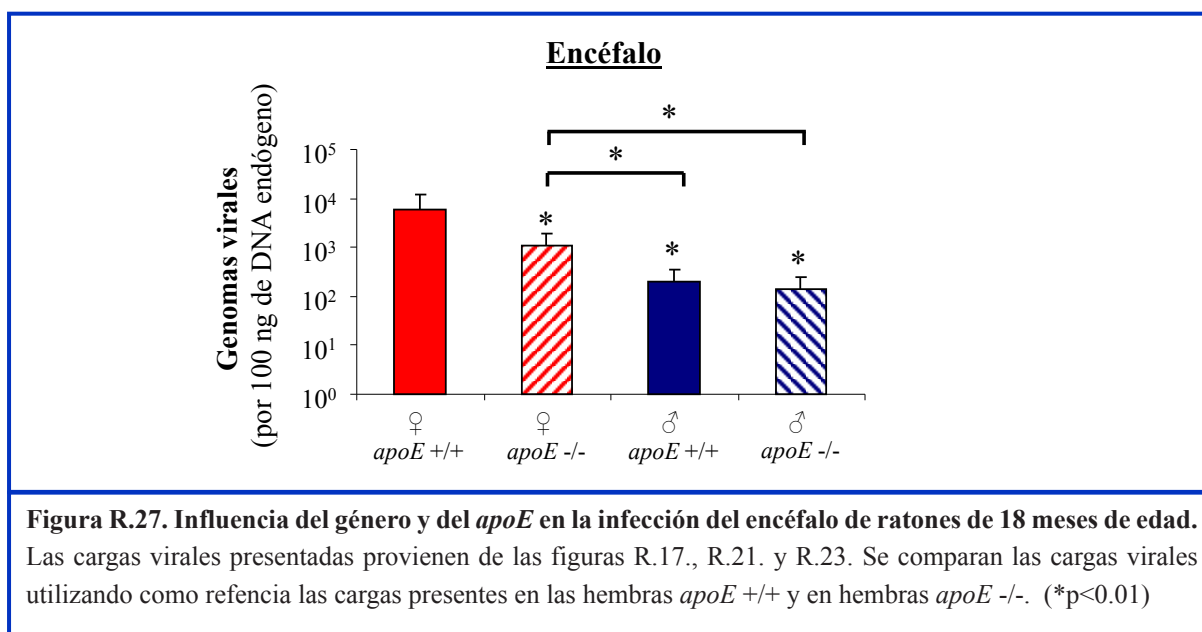
En este sentido, el análisis comparativo de la influencia del género en los animales deficientes en *apoE* (figura R.25.) mostró mayores cantidades de DNA viral en las hembras que en los machos para todos los órganos estudiados (al igual que ocurría con los ratones salvajes; figura R.17.). Estas diferencias, además, fueron significativas para las gónadas, la médula espinal y el encéfalo (* $p < 0.01$). Del mismo modo que ocurría con los ratones salvajes, no se pudo detectar la presencia de genomas virales en la sangre de los ratones *apoE* *-/-*. Los tejidos del sistema nervioso (encéfalo, médula espinal y ganglio trigémino) presentaron cargas virales mayores que los tejidos periféricos (gónadas y glándula adrenal), independientemente del género del animal analizado. Este resultado coincide con el obtenido para los ratones salvajes y corrobora estudios previos en los que se demuestra que estos tejidos son sitios preferenciales para el establecimiento de la latencia (Baringer and Pisani, 1994; Hill y cols., 1986). En el caso de las hembras *apoE* *-/-*, el encéfalo fue el órgano que presentó las mayores concentraciones de DNA viral, seguido por la médula espinal, el ganglio trigémino, la glándula adrenal y por último el ovario. Para los machos *apoE* *-/-*, el encéfalo fue, de nuevo, el órgano con la mayor concentración de DNA viral, seguido por el ganglio trigémino, la médula espinal, la glándula adrenal y los testículos.



El análisis pormenorizado del encéfalo (figura R.26.) reveló que las hembras *apoE* *-/-* presentaban cargas de DNA viral significativamente más altas que los machos en el *mesencéfalo* y en el *diencéfalo*, siendo el *mesencéfalo* la región con concentraciones más altas de DNA viral, seguido del *diencéfalo*, de la *corteza* y por último del *cerebelo*.



Los experimentos mostrados en este apartado revelan la influencia del género y del *apoE* en los niveles de HSV-1 presentes en el encéfalo de los ratones envejecidos (18 meses de edad). De forma especial, se resumen para su análisis en la figura R.27. las cargas virales presentes en el encéfalo de los ratones según la dosis génica de *apoE* y del género. Aquí se observa que las hembras *apoE* *+/+* son las más susceptibles a la infección del encéfalo por HSV-1 ya que son las que presentan niveles virales significativamente más altos de todas las condiciones experimentales estudiadas. A continuación, las hembras *apoE* *-/-* presentan niveles virales más bajos que las *apoE* *+/+* pero significativamente más altos que los machos salvajes (o *apoE* *+/+*) poniendo de manifiesto la importancia de la asociación del *apoE* y del género femenino en la infección viral. Nuevamente, la comparación entre las cargas virales detectadas en los machos refleja la influencia del *apoE* en la infección, ya que los machos *apoE* *+/+* presentan cargas de DNA viral significativamente más altas que los machos *apoE* *-/-*.



A la vista de estos datos, se concluye que el género femenino y la presencia de *apoE* influyen, conjuntamente, en la infección por HSV-1 en los ratones envejecidos aumentando los niveles virales presentes en el encéfalo. De este modo, el género femenino y el *apoE* se convierten en factores de riesgo para el desarrollo de posibles neuropatologías asociadas a la infección por HSV-1 y en especial con la EA.

5.3.3. Determinación de la carga viral en ratones *sod2* +/-.

La deficiencia parcial en el gen *sod2* confiere a los ratones una menor capacidad para la eliminación de aniones superóxido, por lo que presentan mayor daño oxidativo que los ratones salvajes (Kokoszka y cols., 2001). Por este motivo, los ratones *sod2* +/- se usan habitualmente como modelo de envejecimiento acelerado. Con el objetivo de conocer la influencia del gen murino *sod2* en la infección por el HSV-1, se infectaron ratones con deficiencia parcial en este gen (*sod2* +/-) y hermanos de camada salvajes (*sod2* +/+), y se analizó la carga viral presente en la infección aguda y en ratones envejecidos de 18 meses de edad.

5.3.3.1. Infección aguda.

Para analizar la influencia del gen murino *sod2* en la distribución del HSV-1 durante la infección aguda, se inocularon ip ratones *sod2* +/- y hermanos de camada salvajes (*sod2* +/+) con 1x10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se compararon las cargas virales presentes en los diferentes órganos a los 5.7 dpi. La figura R.28. muestra los resultados obtenidos.

Los ratones salvajes (*sod2* +/+) revelaron niveles de DNA viral significativamente más altos (* $p < 0.01$; # $p < 0.05$) que los ratones *sod2* +/- para todos los órganos estudiados (figura R.28.). El perfil de infección de los ratones salvajes fue similar a lo observado anteriormente. Brevemente, el encéfalo fue el órgano con la mayor cantidad de genomas virales de todos los tejidos analizados. La médula espinal presentó niveles de DNA viral similares a la glándula adrenal y mayores que el ganglio trigémino, que fue el tejido con los niveles más bajos de DNA viral. A su vez, el ovario y la glándula adrenal se mostraron como sitios preferenciales de infección, ya que exhibieron cargas de DNA viral elevadas y próximas a las obtenidas para la médula espinal. Además, se detectó DNA viral en la sangre en cantidades elevadas. Por su parte, al analizar las cargas virales en los ratones *sod2* +/- se observó que el encéfalo no fue el órgano con la mayor cantidad de genomas virales de los órganos analizados, ni siquiera de los tejidos del sistema nervioso, puesto que la médula espinal presentó mayores niveles de DNA viral. Por su parte, el ganglio trigémino, al igual que ocurría en los ratones salvajes, mostró los niveles más bajos de DNA viral de los tejidos del sistema nervioso. La glándula adrenal fue el órgano con las mayores cargas de DNA viral de los ratones *sod2* +/-, seguido del ovario. También se detectó DNA viral en la sangre, aunque en este caso con niveles inferiores a los detectados en los ratones salvajes.

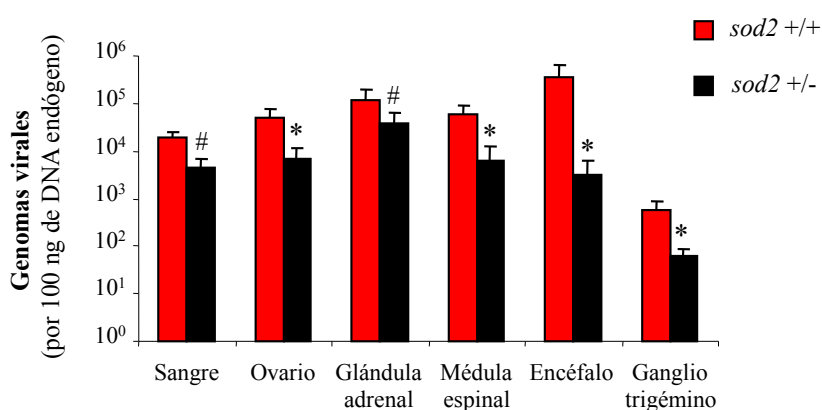


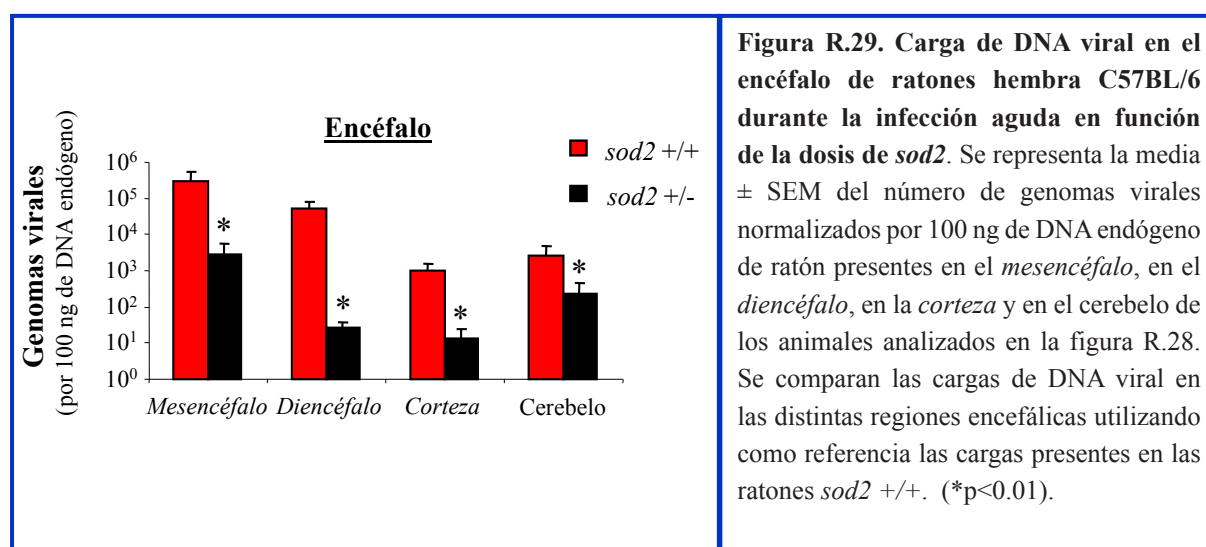
Figura R.28. Carga de DNA viral de ratones hembra C57BL/6 durante la infección aguda en función de la dosis de *sod2*. Se inocularon ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS a los 2 meses de edad hembras C57BL/6 *sod2* +/- y hermanas de camada salvajes (*sod2* +/+). A los 5.7 dpi se sacrificaron 7 hembras salvajes y 6 hembras *sod2* +/- y se determinó por PCR cuantitativa la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón en la sangre, en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino. Se comparan las cargas de DNA viral en los distintos órganos utilizando como referencia las cargas presentes en los ratones *sod2* +/+. (* $p < 0.01$; # $p < 0.05$).

Ratio cargas virales a 5.7 dpi <i>sod2</i> +/+ frente a <i>sod2</i> +/-	
Sangre	4
Ovario	7
Glándula adrenal	3
Médula espinal	10
Encéfalo	112
Ganglio trigémino	9

Tabla R.4. Relación entre las cargas virales a 5.7 dpi de hembras *sod2* +/+ y *sod2* +/-.

Estos resultados indican que la deficiencia parcial en el gen *sod2* dificulta el acceso del HSV-1 al sistema nervioso (al menos a los 5.7 dpi) y en especial al encéfalo de estos ratones. Además, la tabla R.4. refuerza este dato ya que el encéfalo de los ratones *sod2* +/- presentó, aproximadamente, 100 veces menos genomas virales que los ratones salvajes, mientras que la relación de cargas virales del resto de los órganos fue sólo unas 10 veces menor.

El análisis pormenorizado de las cargas virales presentes en las diferentes regiones en que dividimos el encéfalo mostradas en la figura R.29. reveló perfiles de infección similares entre los dos fondos genéticos, con mayores cargas virales para los ratones salvajes. En ambos casos, la región *mesencefálica* presentó los mayores niveles de DNA viral, seguida del *diencefalo*, del cerebelo y de la *corteza* para los ratones salvajes, y del cerebelo, del *diencefalo* y de nuevo de la *corteza* para los ratones *sod2* +/-.



En resumen, las cargas virales detectadas en los ratones *sod2* +/- a los 5.7 dpi indican que la infección en estos animales está desfavorecida con respecto a la infección de los animales salvajes (al menos a este tiempo) y en especial el acceso del HSV-1 al SNC.

5.3.3.2. Infección y envejecimiento.

Una vez caracterizada la infección aguda del HSV-1 en los ratones *sod2* +/-, se estudiaron las cargas virales presentes en estos mismos ratones a los 18 meses de edad. Para ello, se inocularon ip ratones *sod2* +/- y ratones salvajes (*sod2* +/+) de 2 meses de edad con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad, se sacrificaron y se analizaron los niveles de genomas virales en los diferentes tejidos.

Al analizar las cargas virales presentes en los diferentes órganos (figura R.30.), se observó que los ratones *sod2* +/- presentaban niveles de DNA viral mayores que los ratones salvajes en los tejidos nerviosos (médula espinal, encéfalo y ganglio trigémino), a diferencia de lo que ocurría durante la infección aguda (figura R.28.), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Para los dos fondos genéticos, los niveles más altos de genomas virales se detectaron en el encéfalo, seguido de la médula espinal y del ganglio trigémino, lo que refleja el tropismo de este virus de establecer latencia en tejidos nerviosos. Por otra parte, los niveles virales de los órganos periféricos (ovarios y glándulas adrenales) fueron los más bajos de todos los órganos estudiados, y considerablemente más bajos que los detectados en la infección aguda. Además, a este tiempo, al igual que sucedía con otras condiciones experimentales descritas en este trabajo, no se detectó DNA viral en la sangre de los ratones.

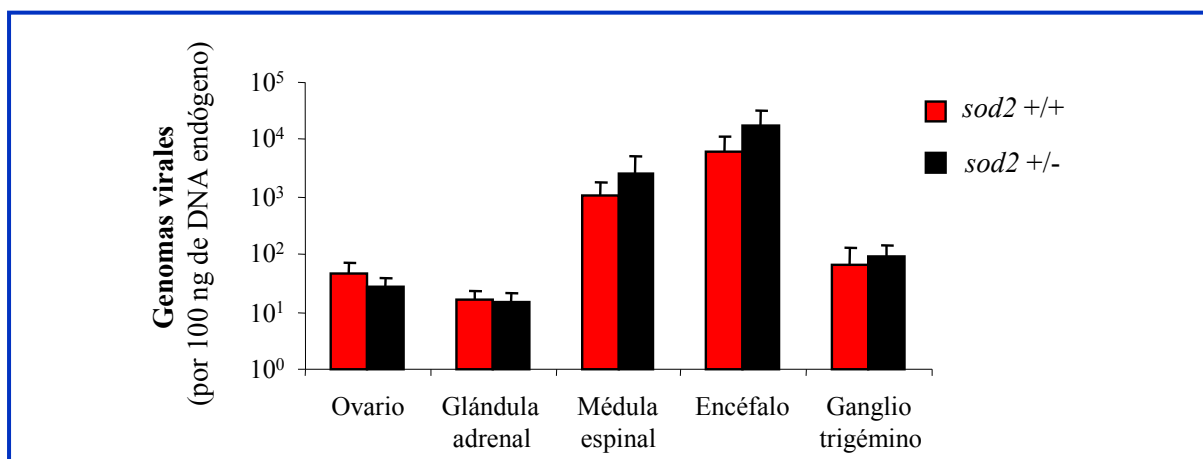
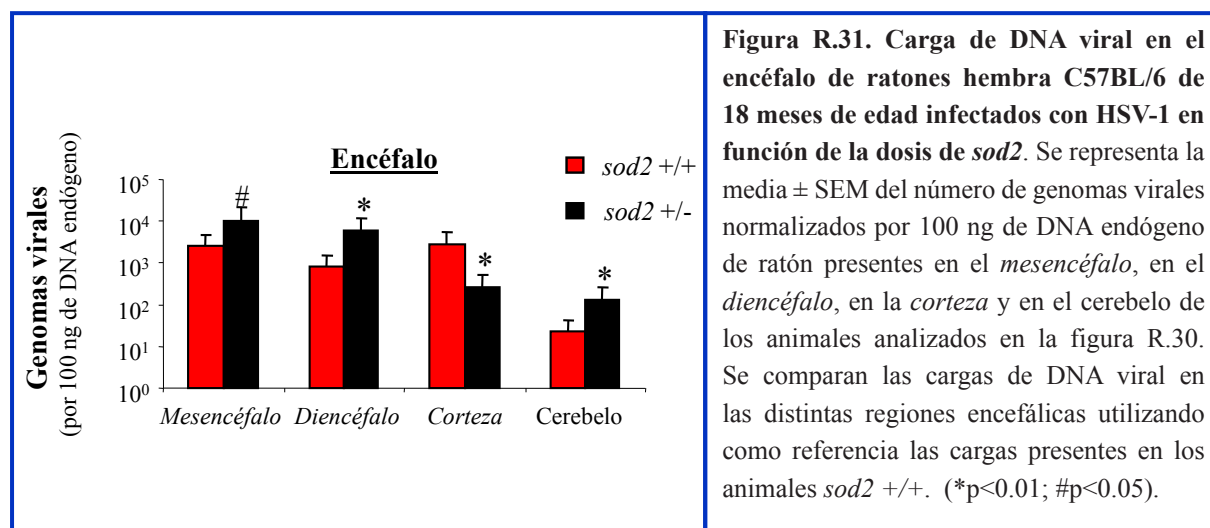


Figura R.30. Carga de DNA viral de ratones hembra C57BL/6 de 18 meses de edad infectados con HSV-1 en función de la dosis de *sod2*. Se inocularon ip con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS a los 2 meses de edad hembras C57BL/6 salvajes (*sod2* +/+) y *sod2* +/- y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad se sacrificaron 15 hembras salvajes y 4 hembras *sod2* +/- y se determinó por PCR cuantitativa la media \pm SEM del número de genomas virales normalizados por 100 ng de DNA endógeno de ratón en el ovario, en la glándula adrenal, en la médula espinal, en el encéfalo y en el ganglio trigémino. La comparación de las cargas virales presentes en los distintos órganos no mostró diferencias significativas en función de la dosis génica.

El estudio detallado del encéfalo de los ratones de 18 meses de edad mostró al *mesencéfalo* de los animales *sod2* +/- como la región con mayor cantidad de genomas virales (figura

R.31.). A excepción de la *corteza*, el resto de las regiones (*mesencéfalo*, *diencéfalo* y cerebelo) presentaron un perfil de infección similar para los dos fondos genéticos, con cargas de DNA viral significativamente mayores ($*p<0.01$; $\#p<0.05$) en las regiones pertenecientes al encéfalo de los ratones *sod2* +/- . La *corteza* fue la región encefálica con mayor cantidad de genomas virales de los ratones salvajes. Para los dos fondos genéticos el cerebelo fue la región con niveles más bajos de DNA viral.



Comparando los resultados mostrados en la figura R.30. con los de la figura R.28., se puede concluir que, si bien el acceso del HSV-1 al sistema nervioso no está favorecido a 5.7 dpi en los ratones *sod2* +/-, este fondo genético facilita el acceso del virus al SNC durante el envejecimiento.

Los experimentos descritos en este capítulo han permitido estudiar cómo se modulan los niveles de HSV-1 en el encéfalo de los ratones envejecidos de 18 meses de edad. Del análisis de dichos experimentos se desprende que los principales factores relacionados con la EA, como son el envejecimiento (R.5.3.1.), el género femenino (R.5.3.2.1.), el genotipo *APOE* $\epsilon 4$ (R.5.3.2.3.) (similar al *apoE* murino) y el daño oxidativo (R.5.3.3.2.) influyen en la infección por HSV-1, aumentando los niveles virales presentes en el encéfalo, tal y como se resume en la tabla R.5. Dicha tabla muestra la relación de las cargas virales presentes en el encéfalo de los ratones para las diferentes condiciones experimentales estudiadas con respecto a la carga viral presente en los ratones macho deficientes en *apoE*, por ser el género masculino, el genotipo *sod2* +/+ y la deficiencia en el gen *apoE* las condiciones más desfavorables para la infección del encéfalo por el HSV-1. Aquí se observa cómo los factores asociados a la EA descritos anteriormente, modulan la presencia de HSV-1 en los ratones envejecidos. La influencia del género, según muestra la

tabla R.5., produce que las cargas virales en el encéfalo de las hembras sean 8 veces más altas que las de los machos cuando los animales son deficientes en *apoE* (ratio = 8.0) y más de 30 veces cuando los animales son salvajes (ratio = 30.7). Por otra parte, el efecto del *apoE* también es evidente en los machos ya que los niveles virales detectados en el encéfalo de los ratones *apoE* +/+ es 1.4 veces más alto que el detectado en el encéfalo de los machos deficientes en dicho gen y 5 veces mayor cuando lo que se comparan son las hembras (ratio = 5.4). Además, los experimentos desarrollados revelan que la dosis de inoculación viral durante la primoinfección también influye en la carga viral presente en el encéfalo de los ratones envejecidos, ya que

<u>Condición experimental</u>	<u>Ratio con respecto a ♂ <i>apoE</i> -/-, <i>sod2</i> +/+</u>
♀ <i>apoE</i> +/+, <i>sod2</i> +/-	119
♀ <i>apoE</i> +/+, <i>sod2</i> +/+ (1x10 ⁷ ufp)	81
♀ <i>apoE</i> +/+, <i>sod2</i> +/+	43
♀ <i>apoE</i> -/-, <i>sod2</i> +/+	8
♂ <i>apoE</i> +/+, <i>sod2</i> +/+	1.4
♂ <i>apoE</i> -/-, <i>sod2</i> +/+	1

Tabla R.5. Relación de la carga viral presente en el encéfalo de los ratones de 18 meses de edad con respecto a la carga viral en el encéfalo de los machos *apoE* -/- *sod2* +/+ de la misma edad.

los animales inoculados con 1x10⁷ ufp de HSV-1 muestran aproximadamente el doble de genomas virales que los inoculados con la dosis habitual 10 veces menor (ratio = 1.9). Por último, el efecto del daño oxidativo en las cargas virales presentes en el encéfalo de los ratones queda demostrado por la presencia de casi 3 veces más genomas virales en el encéfalo de los ratones *sod2* +/- con respecto a los ratones salvajes que no presentan dicho déficit (ratio = 2.8), poniendo de manifiesto la idoneidad de este modelo de infección para el estudio de la neurodegeneración asociada a la infección por HSV-1.

5.3.4. Estudios patológicos en el encéfalo de ratones infectados con HSV-1.

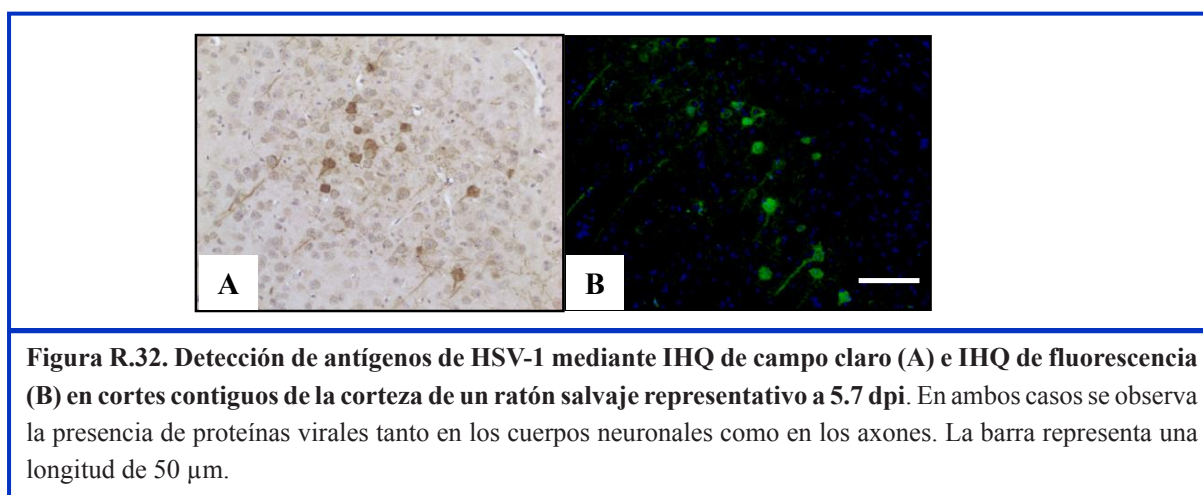
Una vez caracterizada la infección por el virus HSV-1 KOS mediante PCR cuantitativa, se realizaron estudios histológicos con el objetivo de determinar las regiones encefálicas más susceptibles a la infección, así como los cambios patológicos asociados. Del mismo modo, se llevaron a cabo estudios no invasivos para el análisis de las posibles alteraciones neuronales relacionadas con la infección, mediante RMI y espectroscopía. Además, se empleó un test de memoria para analizar los posibles daños cognitivos. En todos estos experimentos se utilizaron ratones C57BL/6 hembra por ser los animales de este género los más susceptibles a la infección.

5.3.4.1. Estudios en ratones salvajes y en ratones *sod2* +/- durante las infecciones aguda y latente.

Con el fin de estudiar las posibles alteraciones neurológicas producidas por el HSV-1 en ratones C57BL/6 salvajes y en ratones *sod2* +/-, se desarrollaron experimentos en ratones de 2 meses de edad durante las infecciones aguda (5.7 dpi) y latente (37 dpi), debido a que a estos tiempos se detectaron mediante PCR las mayores cargas virales en el encéfalo y podrían ser, por tanto, los tiempos en los que se detectarían mayores daños asociados a la infección.

5.3.4.1.1. Detección de proteínas virales.

Con el objetivo de relacionar el posible proceso patológico asociado a la infección con el HSV-1, en primer lugar es necesario demostrar la presencia de virus activo en el encéfalo. Con este fin, se analizaron cortes encefálicos mediante IHQ de campo claro e IHQ de fluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-HSV-1 (según los parámetros descritos en el apartado MM.3.2.4.), obteniendo con ambas técnicas los mismos resultados (figura R.32.). Con este abordaje se pueden localizar de forma específica las áreas encefálicas en las que se encuentran las partículas virales, por lo que esas mismas áreas pueden ser objeto de estudio detallado de diferentes marcadores de neurodegeneración. Las regiones en que dividimos de forma arbitraria el encéfalo para su estudio se indican en la figura MM.2. de materiales y métodos.



En primer lugar, se llevó a cabo un estudio IHQ en el encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- infectados con HSV-1 a los 5.7 dpi y a los 37 dpi, utilizando un anticuerpo anti-HSV-1, que reconoce la mayoría de las glicoproteínas de la envuelta viral. Se analizaron varias regiones encefálicas de los ratones en cada una de las condiciones anteriormente indicadas. La figura R.33. muestra imágenes representativas de la inmunorreactividad contra el HSV-1.

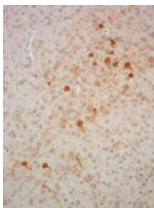
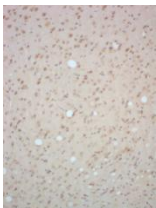
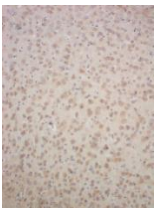
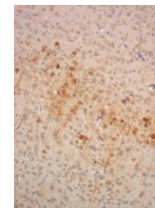
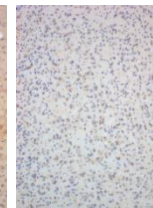
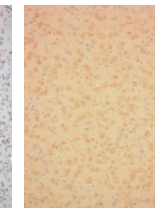

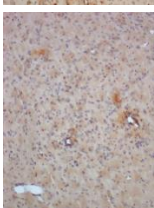
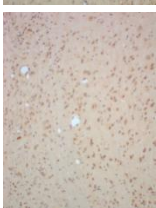
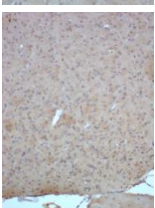
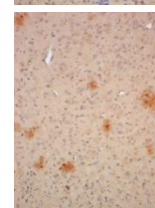
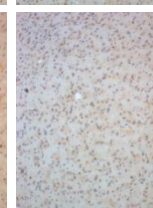
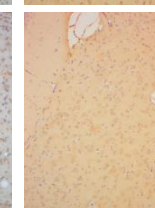
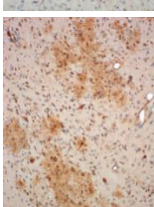
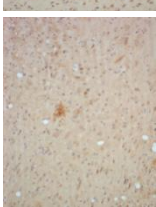
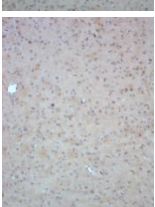
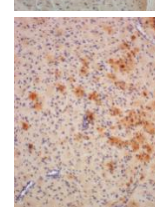
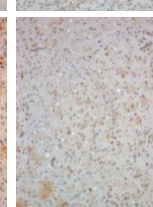
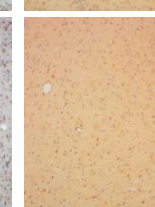

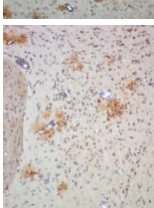
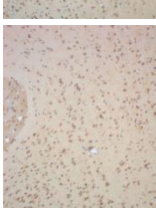
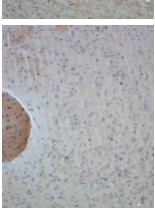
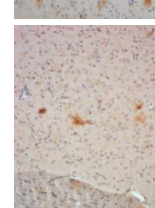
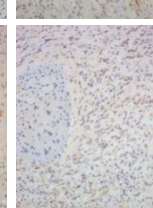
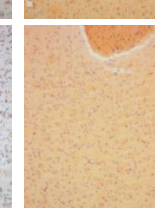
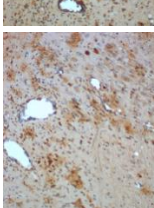
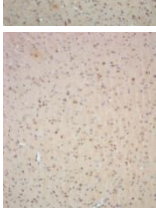
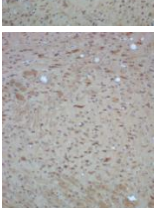
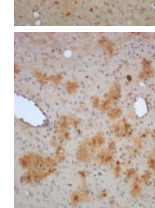
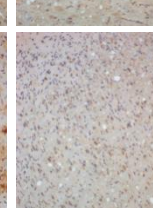
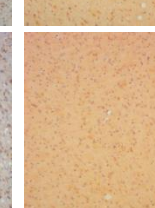

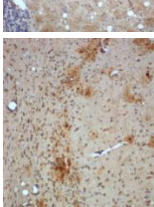
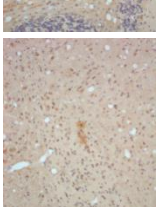
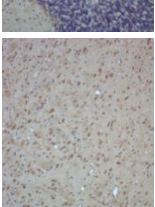
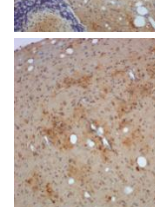
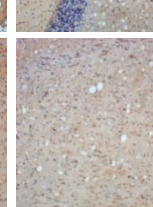
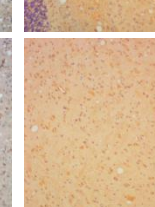
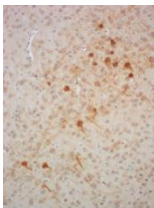
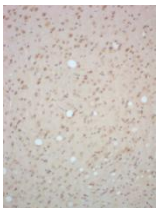
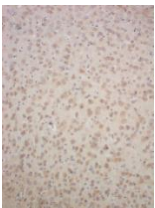
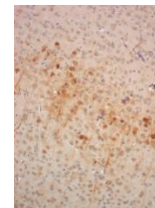
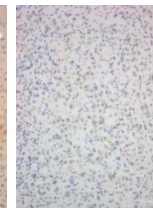
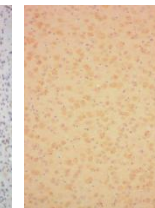

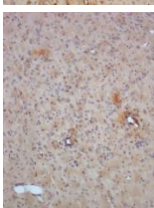
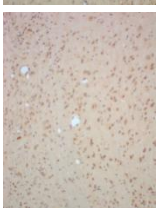
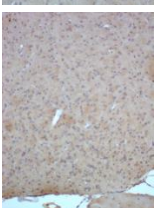
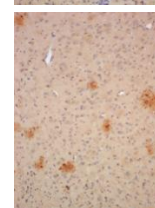
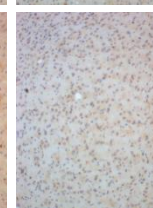
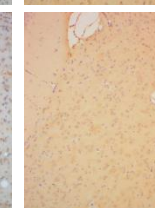
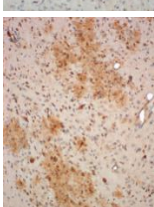
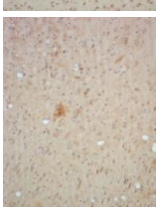
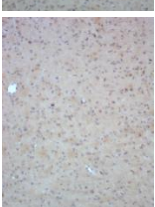
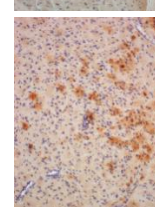
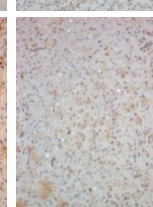
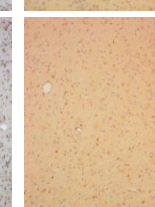

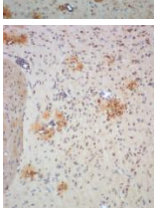
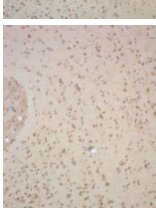
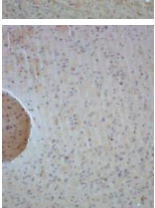
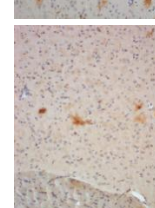
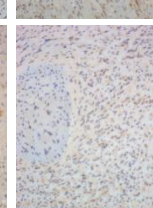
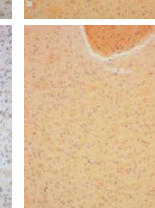
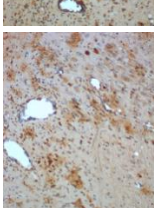
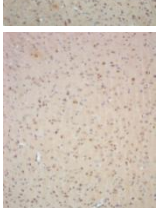
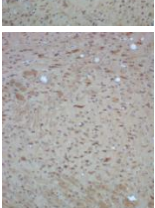
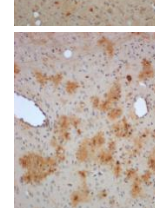
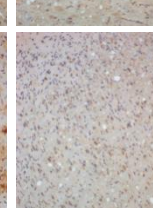
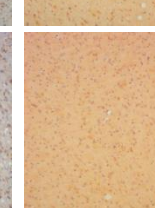

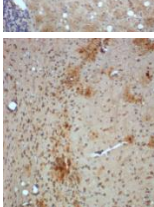
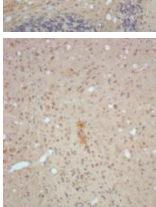
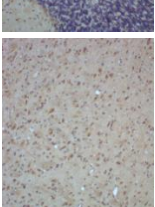
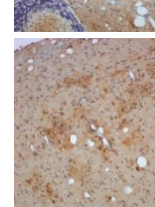
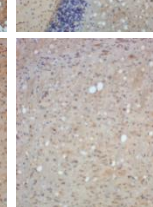
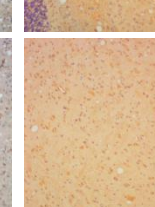
Proteínas Virales	Corteza			Diencéfalo			Mesencéfalo			Cerebelo			
	CZ	TAL	HTAL	AP	MS-PU	MO-ME	CB	CB	CB				
Hembras <i>salvajes</i>													
													
													
Hembras <i>sod2+/-</i>													
													
													

Figura R.33. Detección IHQ del HSV-1 en el encéfalo de ratones C57BL6 salvajes y *sod2* +/-. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 10 hembras salvajes y 10 hembras *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 (infección aguda) y a los 37 dpi (infección latente) se sacrificaron 5 hembras de cada grupo y se les extrajo el encéfalo para el análisis IHQ. Además, se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. Se utilizó un anticuerpo que reconoce la mayoría de las glicoproteínas del HSV-1. Se muestra una imagen representativa de cada una de las regiones en las que se detectó el virus. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; AP: área preóptica; MS: mesencéfalo; PU; puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo. La barra representa una longitud de 100 μ m.

Durante la infección aguda, los cortes del encéfalo de los ratones salvajes mostraron proteínas virales en todas las regiones estudiadas, es decir, en la corteza, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo (mesencéfalo y puente), en la médula oblonga (médula oblonga y médula espinal), en el cerebelo y en el área preóptica. Los focos más numerosos e intensos se localizaron en el hipotálamo y en la región *mesencefálica* que engloba al mesencéfalo y a la médula oblonga. Por otra parte, en la infección latente sólo se detectaron, de forma aislada y puntual, antígenos virales en las regiones en las que se detectaron los focos más intensos y numerosos durante la fase aguda, esto es, en la médula oblonga y en el hipotálamo. Por último, en ninguno de los ratones sin infectar (mock) se detectó inmunorreactividad con el anticuerpo anti-HSV-1, indicando la especificidad de la señal obtenida con dicho anticuerpo.

De igual manera que en los animales salvajes, se detectó inmunorreactividad contra el HSV-1 en todas las regiones analizadas del encéfalo de los ratones *sod2* +/- durante la infección aguda, es decir, se observaron antígenos virales en la corteza, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo, en la médula oblonga, en el cerebelo y en el área preóptica. De nuevo, las áreas encefálicas con mayor presencia de partículas de HSV-1 fueron el hipotálamo, el mesencéfalo y la médula oblonga. Por el contrario, a diferencia de lo que ocurría en los ratones salvajes, en los ratones *sod2* +/- no se detectaron partículas virales durante la infección latente. Por último, en ninguno de los animales *sod2* +/- sin infectar se detectó marcaje viral, corroborando la especificidad del marcaje del anticuerpo anti-HSV-1 detectado en los animales salvajes.

A continuación, se analizó la proporción de ratones que presentaban marcaje contra el HSV-1 en cada una de las regiones estudiadas, lo que indica las regiones más susceptibles a la infección viral. Estos datos se resumen en la tabla R.6.

Durante la infección aguda, se detectaron partículas virales en todos los ratones salvajes (5 de 5) en las regiones *mesencefálica*, y *diencefálica*. Además, a este tiempo se detectaron proteínas virales en el cerebelo en tres animales y tan sólo en la *corteza* de un animal. Esta distribución del virus observada por IHQ se correlaciona con los niveles virales cuantificados por PCR en cada una de las regiones encefálicas (ver figura R.29.). De forma detallada, se observa

que la región *mesencefálica* es la más susceptible a la infección, puesto que todos los ratones presentaron antígenos virales de forma numerosa en dicha región. Estos datos se corroboran con los obtenidos por PCR, ya que ésta fue la región encefálica donde se detectaron mayores niveles virales. El análisis por PCR también reveló al *diencéfalo* como la segunda región más susceptible a la infección viral seguida por el cerebelo, lo que coincide con el análisis IHQ. Además, mediante ambas técnicas la *corteza* se muestra como la región con menor presencia de HSV-1. Por último, durante la fase latente de la infección, se detectaron por IHQ partículas virales en el hipotálamo en dos ratones salvajes y en la médula oblonga de otros dos animales.

En cuanto a los ratones *sod2 +/-*, durante la infección aguda éstos presentaron un patrón de infección similar al obtenido en los ratones salvajes, con la diferencia de que fue menor el número de animales con presencia de partículas virales en cada una de las regiones estudiadas, lo que de nuevo se correlaciona con los datos obtenidos por PCR cuantitativa (ver figura R.29.). En este fondo genético, la región *mesencefálica* fue nuevamente la que mostró una mayor presencia de antígenos virales, detectándose éstos en cuatro de cinco animales. En el *diencéfalo* se detectó el virus en cuatro de cinco casos, y en el cerebelo en dos de cinco. Por último, al igual que sucedía en los ratones salvajes, se detectaron antígenos virales en la *corteza* de un animal *sod2 +/-*. Durante la fase latente de la infección, no se detectaron partículas virales en ningún animal *sod2 +/-*.

Proteínas virales		Corteza	Diencéfalo			Mesencéfalo		Cerebelo
		CZ	TAL	HTAL	AP	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 5.7 dpi	1/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	3/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Hembras <i>sod2 +/-</i>	HSV-1 5.7 dpi	1/5	2/5	4/5	2/5	4/5	4/5	2/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Tabla R.6. Relación del número de animales que presentan inmunomarcaje de proteínas virales en diferentes regiones encefálicas con respecto al total de animales estudiados durante la infección con HSV-1 mediante el análisis de cortes teñidos con un anticuerpo anti-HSV-1. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 10 hembras salvajes y 10 hembras *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 dpi y a los 37 dpi se analizó la presencia de proteínas virales en el encéfalo de 5 animales de cada condición mediante IHQ usando un anticuerpo anti-HSV-1. Se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; ; AP: área preóptica MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

En resumen, la mayor detección de antígenos virales se produjo durante la infección aguda (figura R.33. y tabla R.6.) tanto en los ratones salvajes como en los *sod2* +/-, no detectándose diferencias apreciables en la intensidad de la señal, pero sí en el número de animales infectados (mayor para los ratones salvajes). Sin embargo, a los 37 dpi sólo se detectaron marcas de virus aisladas en los ratones salvajes. La fase latente de la infección por HSV-1 se caracteriza por la ausencia de la replicación viral, por lo que esta detección viral puede deberse a una reactivación puntual y localizada del virus o bien a restos de proteínas virales procedentes de la fase aguda de la infección, que aún no han sido eliminados del encéfalo.

En conjunto, estos resultados sugieren una ruta de invasión viral similar para los dos fondos genéticos. El virus accede al encéfalo a través de la médula espinal colonizando las regiones ventrales del mismo: médula oblonga e hipotálamo. Desde estos puntos progresa hacia regiones más distales atravesando el mesencéfalo y el tálamo, hasta alcanzar (en determinadas ocasiones) el cerebelo y la corteza. Además, el menor número de ratones *sod2* +/- infectados en cada una de las regiones indica una mayor resistencia a la neuroinvasión en este fondo genético a este tiempo, como ya se ha observado en el análisis de las cargas virales por PCR mostrado en la figura R.29.

5.3.4.1.2. Estudio de la neuroinflamación.

Diversos estudios han relacionado la infección del encéfalo por HSV-1 con procesos neuroinflamatorios, tanto en humanos (Whitley and Gnann, 2002) como en ratones (Esiri y cols., 1995). Además, se ha descrito la presencia de marcadores de inflamación en cerebros de enfermos de alzhéimer (Wyss-Coray and Mucke, 2002). Con estos antecedentes, se estudió en el modelo de infección hematogena utilizado en este trabajo la posible respuesta neuroinflamatoria inducida por HSV-1. Para ello, se analizaron mediante tinción con H&E cortes contiguos del encéfalo de los ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- en los que se había estudiado previamente la presencia de partículas de HSV-1 durante las infecciones aguda y latente, así como de los animales control sin infectar.

El análisis de la neuroinflamación se realizó mediante la tinción con H&E, que permite identificar los acúmulos de los diferentes tipos celulares implicados en la inflamación como son los linfocitos, los monocitos, los macrófagos o los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), que de forma general denominamos infiltrados mononucleares. El estudio de los cortes del encéfalo teñidos con H&E mostró numerosos focos de inflamación en las regiones encefálicas en las que se detectaron antígenos virales y sobre todo próximos a vasos sanguíneos (figura R.34.).

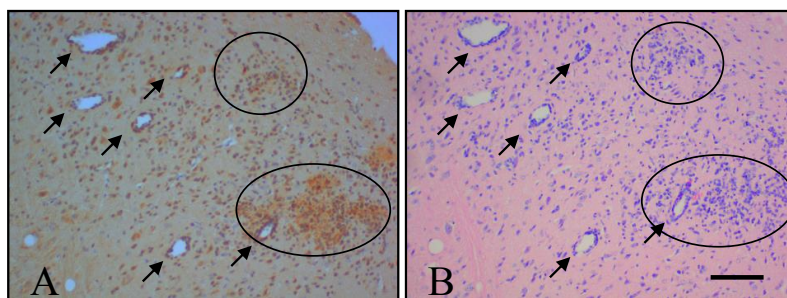


Figura R.34. Imágenes representativas de la colocación de la inflamación con las áreas de infección.

Se muestran cortes contiguos del encéfalo de un ratón salvaje durante la infección aguda por HSV-1 teñidos con un anticuerpo anti-HSV-1 (A) y con H&E (B). Los óvalos rodean regiones con presencia de antígenos virales (A) y focos de inflamación (B). Las flechas señalan vasos sanguíneos rodeados de infiltrados mononucleares. La barra representa una longitud de 100 μ m.

De forma detallada, los animales salvajes diseccionados a 5.7 dpi mostraron numerosos focos de inflamación en las regiones encefálicas en las que se detectaron antígenos virales, es decir, en la *mesencefálica*, en la *diencefálica* y en el cerebelo (figura R.35.). Sin embargo, no se observó inflamación en la *corteza* de ningún ratón. Por su parte, durante la infección latente la neuroinflamación fue menos acusada y se restringió a la región *mesencefálica* de aquellos animales que presentaron inmunorreactividad contra el HSV-1. Finalmente, el análisis de los ratones sin infectar reveló la presencia de infiltrados difusos en el mesencéfalo y próximos a un vaso sanguíneo en la médula espinal en uno de los casos.

Al igual que sucedía en los ratones salvajes, los animales *sod2* +/- presentaron neuroinflamación de manera acusada durante la infección aguda. En estos ratones se detectó inflamación en las regiones *mesencefálica* y *diencefálica*, en el cerebelo y, a diferencia de las hembras salvajes, también de manera minoritaria y puntual en la *corteza*. Sin embargo, los ratones *sod2* +/- estudiados durante la infección latente sólo presentaron infiltrados rodeando un vaso sanguíneo en la médula espinal en uno de los casos, la misma señal que se obtuvo en los *sod2* +/- sin infectar.

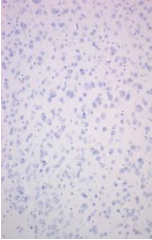
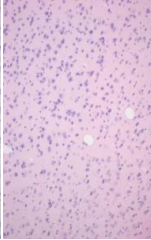
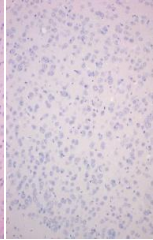
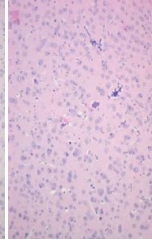
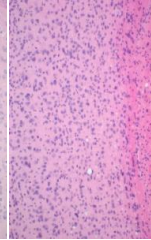
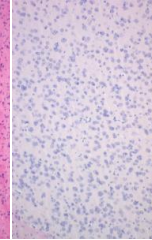
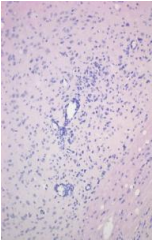
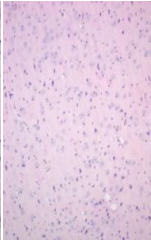
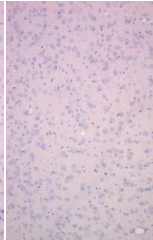
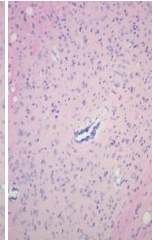
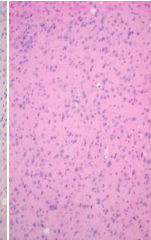
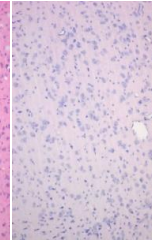
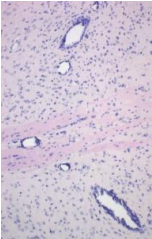
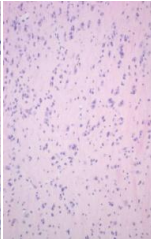
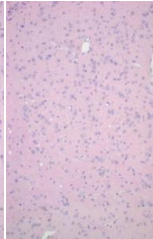
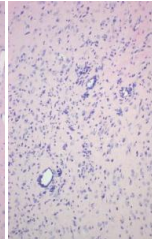
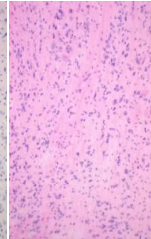
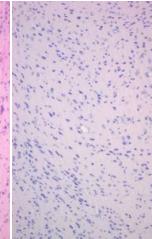
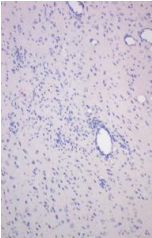
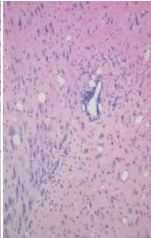
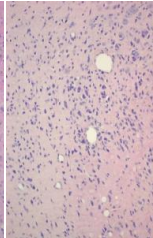
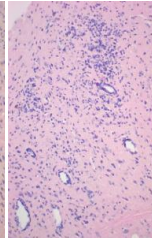
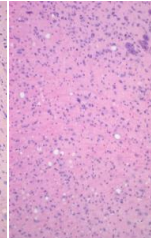
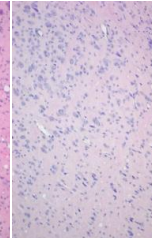
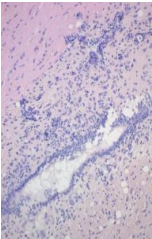
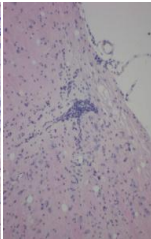
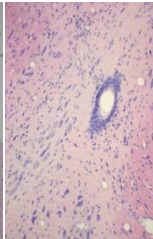
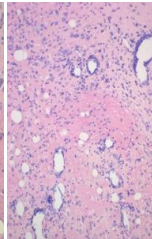
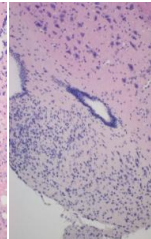
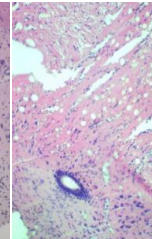
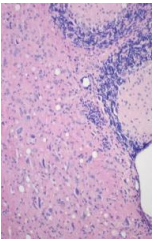
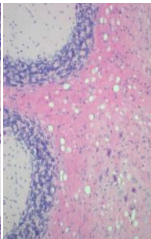
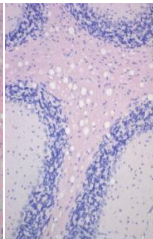
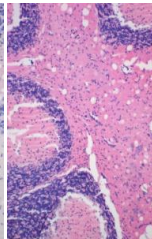
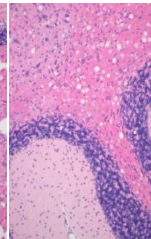
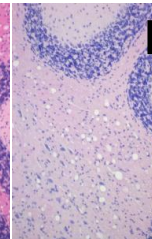
Inflamación	Corteza		Diencéfalo		Mesencéfalo		Cerebelo	
	CZ	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB		
Hembras <i>salvajes</i>								
								
								
Hembras <i>sod2+/-</i>								
								
								

Figura R.35. Detección de inflamación mediante tinción con H&E en el encéfalo de ratones C57BL6 salvajes y *sod2* +/-. Se inocularon ip 10 hembras salvajes y 10 hembras *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 y 37 dpi se sacrificaron 5 hembras de cada grupo y se les extrajo el encéfalo para el análisis de la inflamación. Además, se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. Se muestran imágenes representativas de las regiones en las que se detectó inflamación. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo. La barra representa una longitud de 100 μ m.

Una vez descritas las áreas que presentaron focos de inflamación se determinó el número de áreas afectadas en el total de los ratones estudiados (tabla R.7.).

Los ratones salvajes presentaron inflamación durante la infección aguda en la región *mesencefálica* en todos los casos analizados (5 de 5). A este tiempo, se detectó inflamación en la región *diencefálica* en tres de cinco animales y la misma relación se obtuvo en el cerebelo. Por último, no se detectó inflamación en la *corteza* de ningún ratón salvaje a 5.7 dpi. Como se puede observar tras comparar esta tabla (R.7.) con la R.6., no se detectaron focos de inflamación en todas las zonas con inmunorreactividad contra el HSV-1. Esto puede deberse a que la inflamación aparece 24 horas después de la detección de las partículas virales, por lo que podría estar existiendo un retraso en la aparición del proceso inflamatorio en las áreas de infección (Anderson and Field, 1983; Esiri y cols., 1995). Por su parte, durante la infección latente la inflamación se restringió al mesencéfalo y a la médula espinal de dos ratones, los cuales presentaron también partículas virales. Finalmente, el análisis de los ratones salvajes mock reveló la presencia de infiltrados difusos en el mesencéfalo de un ratón y en la médula espinal de otro.

A diferencia de lo descrito en los animales salvajes, el *mesencéfalo* de los animales *sod2* +/- durante la infección aguda no fue la región que presentó inflamación de forma más consistente, ya que ésta sólo fue observada en tres animales. A este tiempo, la región *diencefálica* de los ratones *sod2* +/- mostró inflamación en cuatro animales. El cerebelo tan sólo mostró inflamación en un animal *sod2* +/- y la *corteza*, al contrario que lo observado en los animales salvajes, presentó pequeños infiltrados en un ratón *sod2* +/- asociados a un foco de infección. El análisis de los ratones *sod2* +/- infectados latentemente y de los animales sin infectar reveló la presencia de infiltrados perivasculares, tan sólo, en la médula espinal de un ratón de cada condición.

Neuroinflamación		Corteza	Diencefalo		Mesencéfalo		Cerebelo
		CZ	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 5.7 dpi	0/5	3/5	4/5	4/5	5/5	3/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 5.7 dpi	1/5	2/5	4/5	3/5	3/5	1/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5

Tabla R.7. Relación del número de animales que presentan inflamación en diferentes regiones encefálicas con respecto al total de animales estudiados mediante el análisis de cortes encefálicos teñidos con H&E. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 10 hembras C57BL/6 salvajes y 10 hembras *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 y 37 dpi se sacrificaron 5 hembras por tiempo y condición y se les extrajo el encéfalo, que se teñió con H&E. Se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

Los resultados presentados indican que existe una fuerte respuesta neuroinflamatoria ante la infección hematógena por el HSV-1, tanto en ratones salvajes como en ratones *sod2* +/-, principalmente durante la fase aguda de la infección. Además, permiten concluir que la deficiencia parcial en el gen *sod2*, no conlleva un incremento en la neuroinflamación en estos ratones a este tiempo.

5.3.4.1.3. Detección de daño oxidativo.

La infección por HSV-1 se ha relacionado con la aparición de daño oxidativo en modelos de infección celulares (Kavouras y cols., 2007) y animales (Valyi-Nagy y cols., 2000). Así pues, una vez descrita la presencia de partículas virales en el encéfalo de los ratones en el modelo de infección hematógena por HSV-1, junto con el análisis de inflamación en las mismas regiones, se estudió la posible existencia de daño oxidativo asociado a la infección. Para ello, se analizó el

encéfalo de ratones hembra C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- infectados con HSV-1 mediante IHQ con un anticuerpo anti-HNE. Este anticuerpo reconoce un subproducto de la peroxidación de los lípidos presentes en las células, fundamentalmente en las membranas plasmáticas, denominado 4-hidroxi-2-nonenal o aducto de Michael.

El análisis del marcaje generado por el anticuerpo anti-HNE en los ratones salvajes durante la infección aguda, reveló un patrón citoplasmático e intenso en el mesencéfalo, en la médula oblonga y en el cerebelo, no detectándose señal en el resto de regiones encefálicas. La figura R.36. muestra imágenes representativas de las regiones encefálicas en las que se detectó inmunorreactividad contra el HNE. Por su parte, los encéfalos de los ratones diseccionados a 37 dpi mostraron el producto de la oxidación de los lípidos solamente en la médula oblonga y asociadas a focos de inflamación. En cambio, ninguna región de los ratones sin infectar mostró inmunorreactividad contra el HNE.

Por su parte, los ratones *sod2* +/- también mostraron células intensamente marcadas con el anticuerpo anti-HNE durante la infección aguda en las mismas regiones encefálicas que los ratones salvajes. Sin embargo, a diferencia de lo observado en las hembras salvajes, durante la infección latente no se detectaron lípidos oxidados en los animales *sod2* +/- . Por último, en los ratones *sod2* +/- sin infectar se detectó inmunorreactividad contra el HNE en la médula oblonga y en el cerebelo, aunque de forma menos intensa y menos numerosa que en los casos anteriores.

Además del estudio cualitativo, el análisis del encéfalo de los ratones tras la IHQ contra el HNE permitió determinar el número de animales con daño oxidativo en las diferentes regiones encefálicas con respecto al total de animales analizados (tabla R.8.). Los ratones salvajes mostraron marcaje contra el HNE durante la infección aguda en la médula oblonga y en el cerebelo en cuatro animales y en el mesencéfalo en dos, no detectándose señal en ninguna otra región encefálica. Por su parte, a 37 dpi tan sólo se observó inmunorreactividad contra el HNE en la médula oblonga, asociada a áreas de inflamación de dos animales. Por último, en los ratones mock no se detectó señal en ninguna región encefálica. La presencia de daño oxidativo en la región mesencefálica es compatible con el hecho de que esta región es la más susceptible a la infección por HSV-1, tanto en condiciones agudas (como se observa por PCR cuantitativa e IHQ) como durante la latencia, ya que durante esta fase el mesencéfalo es la única región encefálica que presenta inmunorreactividad contra el HSV-1 y neuroinflamación. Sin embargo, la presencia de daño oxidativo en el cerebelo puede deberse a una mayor susceptibilidad de las neuronas que lo conforman.

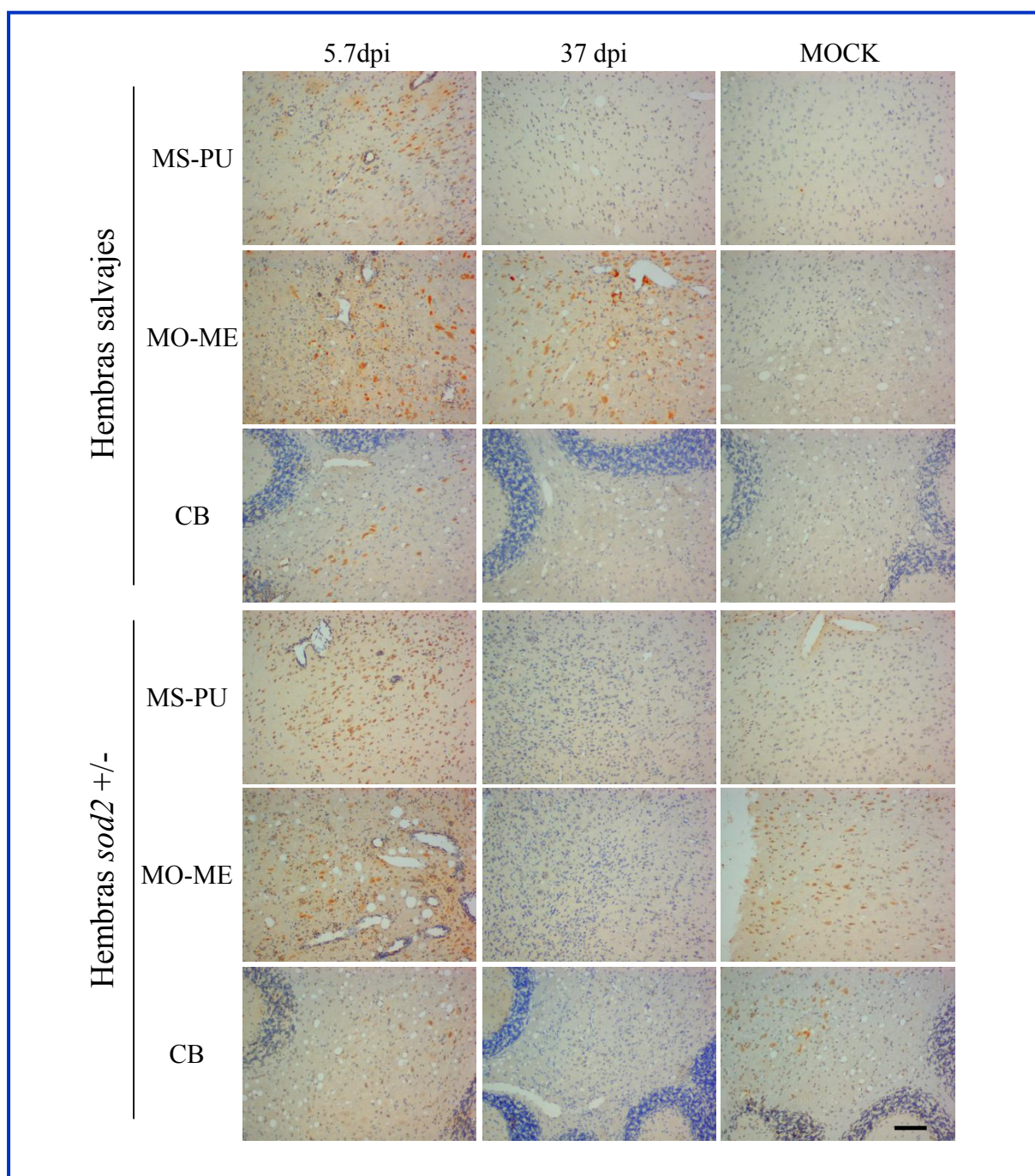


Figura R.36. Detección de daño oxidativo en ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/-. Se infectaron ip hembras C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- de dos meses de edad con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 y 37 dpi se sacrificaron 5 ratones de cada grupo y se determinó la inmunorreactividad con el anticuerpo anti-HNE en muestras de encéfalo. Se utilizaron como controles 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad. Se muestran imágenes representativas de las regiones en que se detectó inmunomarcaje contra HNE. MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo. La barra representa una longitud de 100 μ m.

Por su parte, durante la infección aguda los ratones *sod2* +/- presentaron el mismo patrón de distribución de daño oxidativo que los animales salvajes (tabla R.8.). De nuevo, sólo el mesencéfalo de tres animales, la médula oblonga de cuatro y el cerebelo de un animal fueron las únicas regiones encefálicas que mostraron inmunorreactividad contra el HNE. También en los animales *sod2* +/- la distribución de la señal se puede explicar por la presencia mayoritaria del HSV-1 en estas regiones. Durante la infección latente, sin embargo, no se detectó reactividad contra el HNE en los ratones *sod2* +/- . Sorprendentemente, los ratones *sod2* +/- sin infectar presentaron inmunomarcaje contra el HNE en cuatro de cinco animales en la médula oblonga y en dos de cinco animales en el cerebelo, aunque la intensidad de la señal detectada fue más débil y restringida a un menor número de células que en el resto de condiciones.

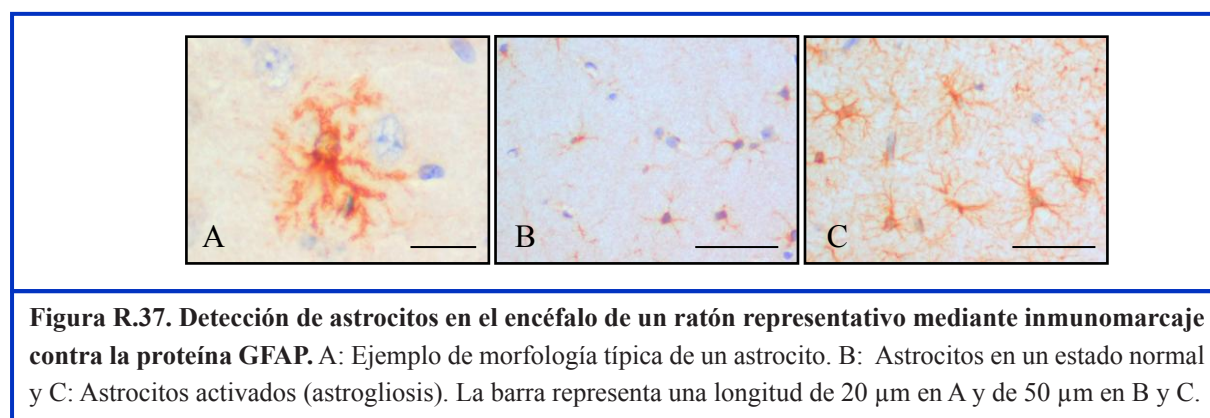
Daño oxidativo		Corteza	Diencefalo		Mesencéfalo		Cerebelo
		CZ	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 5.7 dpi	0/5	0/5	0/5	2/5	4/5	4/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 5.7 dpi	0/5	0/5	0/5	3/5	4/5	1/5
	HSV-1 37 dpi	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	2/5

Tabla R.8. Relación del número de animales que presentan daño oxidativo en el encéfalo mediante inmunomarcaje contra HNE con respecto al total de animales estudiados durante la infección con HSV-1. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 10 hembras salvajes y 10 *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 y 37 dpi se sacrificaron 5 animales por tiempo y condición y se les extrajo el encéfalo. Se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. Se utilizó un anticuerpo anti-HNE para estudiar el daño oxidativo presente en el encéfalo. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

En resumen, las regiones encefálicas que presentan inmunorreactividad frente al HNE son las que muestran una mayor inflamación. Además, esta inmunorreactividad se restringe a las zonas con mayor presencia de partículas virales como son el mesencéfalo y la médula oblonga. Por tanto, se puede concluir que la infección hematógena por HSV-1 induce un proceso inflamatorio que conlleva la aparición de daño oxidativo en las regiones más susceptibles a la infección viral.

5.3.4.1.4. Detección de astrogliosis.

Los astrocitos se activan ante diferentes patologías que afectan al sistema nervioso, como pueden ser las infecciones (Mucke and Eddleston, 1993) o la EA (Rodríguez y cols., 2009), en un proceso denominado astrogliosis que se caracteriza por el incremento en el número y en el tamaño de los astrocitos. Así pues, como los resultados presentados previamente indican que el HSV-1 invade el SNC e induce inflamación y daño oxidativo en el encéfalo de los ratones, se estudió la posible astrogliosis asociada a la infección. Para ello, se analizó el encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- inoculados con HSV-1 durante las fases aguda y latente de la infección, así como el encéfalo de ratones mock, mediante IHQ con un anticuerpo anti-GFAP que reconoce la proteína fibrilar glial ácida presente en los astrocitos (figura R.37.).



El análisis detallado del encéfalo de los ratones salvajes diseccionados durante la infección aguda (figura R.38.) reveló la presencia de astrocitos de forma numerosa en el bulbo olfatorio y en las regiones donde abundan las fibras nerviosas como son el hipocampo, la fimbria del hipocampo, el cuerpo calloso y el fórnix. Además, a este tiempo post-infección también se observaron astrocitos aunque en menor número y de menor tamaño en las regiones encefálicas en las que se detectó inflamación asociada a la infección, esto es, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga, no detectándose inmunorreactividad contra GFAP ni en la corteza ni en el cerebelo de los ratones.

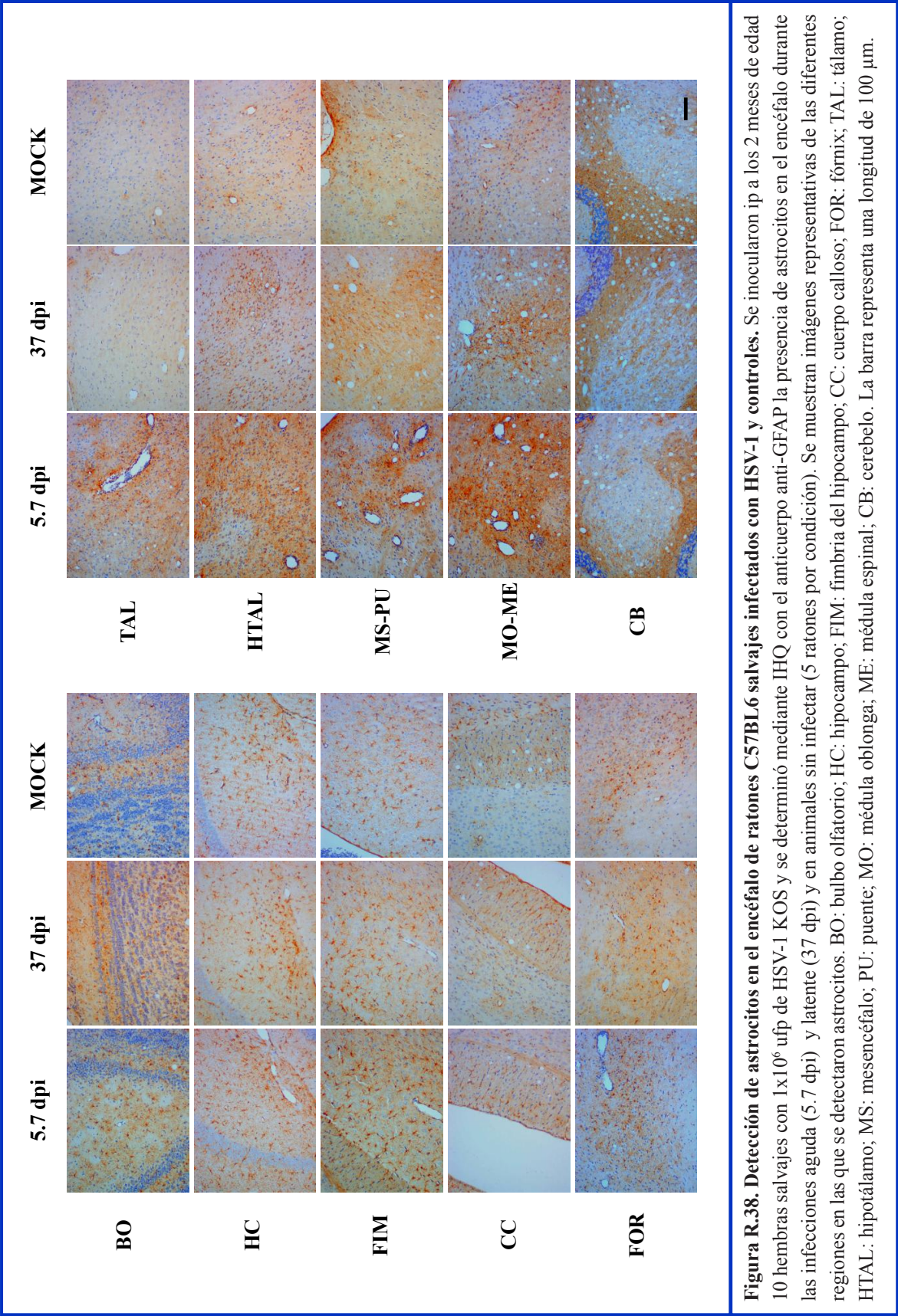
Por su parte, durante la infección latente también se detectaron astrocitos en los animales salvajes en el bulbo olfatorio y en las regiones ricas en fibras nerviosas en igual número e intensidad que durante la fase aguda. Sin embargo, a este tiempo (37 dpi) sólo se observó marcaje contra GFAP en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga, siendo éstas últimas las áreas en las que también se detectó inflamación.

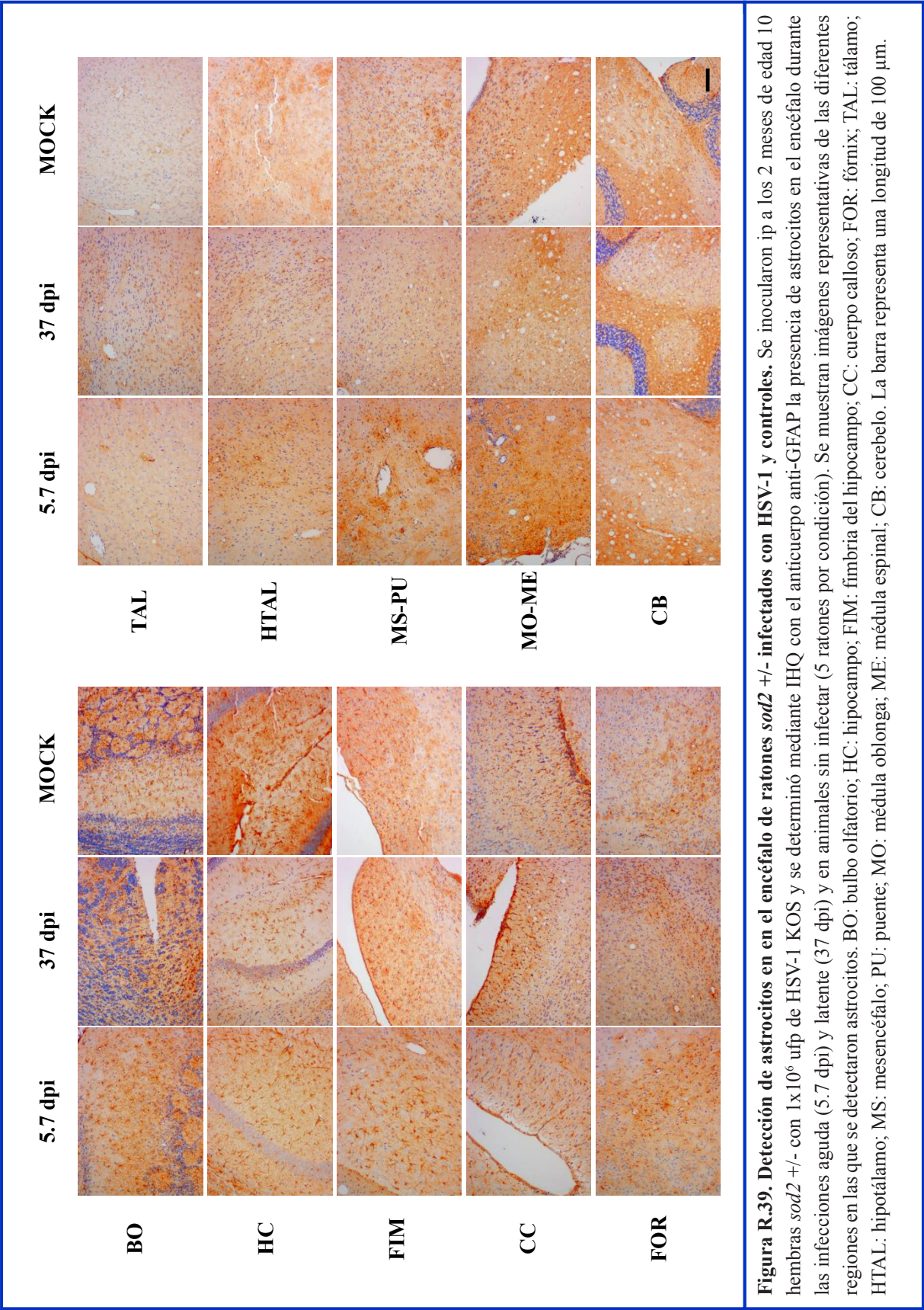
Por último, los animales salvajes sin infectar mostraron el mismo tipo de marcaje en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo, en el cuerpo calloso y en el fórnix que los animales infectados durante las fases aguda y latente, indicando que la detección de los astrocitos en estas áreas no depende de la infección por HSV-1. Además, estos animales revelaron inmunorreactividad contra GFAP en el mesencéfalo y en la médula oblonga, aunque de menor intensidad que la observada en los animales infectados, poniendo de manifiesto el efecto de la infección sobre la astrogliosis.

El estudio del marcaje contra GFAP en los ratones *sod2* +/- (figura R.39.) mostró el mismo esquema de distribución de astrocitos que el descrito para los animales salvajes. En las hembras *sod2* +/- analizadas a 5.7 dpi, al igual que en las hembras salvajes, se observaron astrocitos de forma intensa y numerosa en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo, en el cuerpo calloso y en el fórnix. También se detectaron astrocitos en las regiones que presentaron partículas virales e inflamación, es decir, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga, aunque en menor número y de menor tamaño que los detectados en el bulbo olfatorio y en las áreas ricas en fibras.

Nuevamente, durante la infección latente los ratones *sod2* +/- mostraron astrocitos en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo, en el cuerpo calloso y en el fórnix, en igual número que los observados durante la infección aguda. Además, al igual que en los ratones salvajes, los animales *sod2* +/- presentaron inmunorreactividad contra GFAP a este tiempo en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga.

Finalmente, el estudio de los ratones *sod2* +/- mock reveló numerosos astrocitos en el bulbo olfatorio y en las regiones encefálicas con presencia mayoritaria de fibras nerviosas, coincidiendo con los resultados observados en los animales salvajes y en los animales *sod2* +/- infectados, lo que sugiere que la presencia de astrocitos en estas regiones es independiente del HSV-1 y de la deficiencia parcial en *sod2*, al menos a este tiempo. Por último, los animales *sod2* +/- mock revelaron inmunorreactividad contra GFAP en el mesencéfalo y en la médula oblonga del mismo modo que los ratones salvajes, aunque nuevamente de forma menos intensa y en un menor número de astrocitos que la presentada por los animales infectados, indicando la influencia del HSV-1 en la detección de astrocitos.





Además, el estudio IHQ permitió determinar el número de animales que mostraron astrogliosis en diferentes regiones encefálicas para cada una de las condiciones experimentales (tabla R.9.).

Los datos mostrados en la tabla R.9. revelan que todos los animales estudiados presentaron marca astrocítica de forma consistente en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo, en el cuerpo calloso y en el fórnix, independientemente del tiempo post-infección al que fueran analizados (5.7 dpi, 37 dpi o mock) y del fondo genético (salvajes o *sod2* +/-), indicando que la presencia de astrocitos en estas áreas encefálicas se debe a la fisiología normal del encéfalo. Sin embargo, en el resto de las regiones encefálicas se encontró una distribución diferencial de los astrocitos en función del tipo de infección. En todas las hembras salvajes sacrificadas durante la infección aguda se detectaron astrocitos en el mesencéfalo y en la médula oblonga, y sólo en cuatro de cinco ratones en el hipotálamo y en dos de cinco ratones en el tálamo, lo que se correlaciona con la severidad de la inflamación detectada en estas áreas. Durante la infección latente, el número de ratones salvajes que presentaron astrogliosis en las diferentes áreas fue menor. A este tiempo, sólo la médula oblonga de tres ratones, el mesencéfalo de dos y el hipotálamo de un animal mostraron astrogliosis, correlacionándose nuevamente esta proporción con los datos de neuroinflamación. Por su parte, los ratones mock salvajes presentaron marca de astrocitos en la médula oblonga y en el mesencéfalo en 2 animales, aunque en menor cantidad e intensidad que en los casos anteriores. Finalmente, como se observa en la tabla no se detectaron astrocitos en el cerebelo de ningún ratón salvaje.

Por su parte, los ratones *sod2* +/- presentaron marca de astrocitos de forma consistente en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo y en el fórnix, independientemente de la infección por HSV-1. Sin embargo, al igual que sucedía en los ratones salvajes, el resto de áreas estudiadas mostraron astrogliosis de forma diferencial dependiendo del estado de la infección. A los 5.7 dpi las hembras *sod2* +/- presentaron marca de astrocitos en las diferentes regiones encefálicas en un menor número de ratones que en el caso de las hembras salvajes, ya que sólo se detectaron astrocitos en la médula oblonga y en el hipotálamo en tres animales *sod2* +/- y en el mesencéfalo y en el tálamo en un ratón *sod2* +/-. Esta diferencia, probablemente, se debe a que a este tiempo la invasión del encéfalo por el HSV-1 en los ratones *sod2* +/- está menos favorecida que en los ratones salvajes y, por tanto la activación de los astrocitos es menor. Por su parte, durante la infección latente el número de animales *sod2* +/- que presentaron marca de astrocitos en las diferentes regiones fue aún menor, ya que sólo se detectaron astrocitos en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga en dos ratones. En los ratones *sod2* +/- sin infectar (al igual que lo observado en los ratones salvajes) sólo el mesencéfalo en un ratón y la médula oblonga en dos ratones mostraron marca de astrocitos sugiriendo una especial

susceptibilidad de estas regiones encefálicas a la astrogliosis. Por último, y coincidiendo con los resultados de los ratones salvajes, en ninguno de los ratones *sod2* +/- se detectaron astrocitos en el cerebelo.

Astrogliosis		Corteza				Diencefalo			Mesencéfalo		Cerebelo
		BO	HC	FIM	CC	FOR	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 5.7 dpi	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	4/5	5/5	5/5	0/5
	HSV-1 37 dpi	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	1/5	2/5	3/5	0/5
	MOCK	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	2/5	2/5	0/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 5.7 dpi	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	3/5	1/5	3/5	0/5
	HSV-1 37 dpi	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	2/5	2/5	2/5	0/5
	MOCK	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5

Tabla R.9. Relación del número de ratones que presentan astrogliosis mediante inmunomarcaje contra GFAP con respecto al total de ratones estudiados durante la infección con HSV-1. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 10 hembras C57BL/6 salvajes y 10 hembras *sod2* +/- con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 5.7 y 37 dpi se sacrificaron 5 animales por tiempo y condición y se les extrajo el encéfalo. Se emplearon 5 hembras C57BL/6 salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. Se utilizó un anticuerpo anti-GFAP para estudiar la presencia de astrocitos en el encéfalo de los ratones. BO: bulbo olfatorio; HC: hipocampo; FIM: fimbria del hipocampo; CC: cuerpo calloso; FOR: fórnix; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo sugieren que la infección por HSV-1 produce una activación de los astrocitos durante la infección aguda, que sólo se mantiene en los animales infectados latentemente que presentan áreas de inflamación. Además, la deficiencia parcial de *sod2* no produce un incremento significativo de la astrogliosis en los ratones de dos meses de edad.

Resumen de los estudios neuropatológicos realizados en ratones durante las infecciones aguda y latente con HSV-1.

El estudio del efecto de la neuroinfección por HSV-1 en los ratones salvajes revela que el virus alcanza el encéfalo de los ratones durante la fase aguda de la infección, induciendo un proceso inflamatorio en todas las regiones encefálicas en las que se detectan las partículas virales. Además, en las áreas encefálicas donde la infección es más productiva, el virus induce también daño oxidativo y astrogliosis. Por otra parte, los resultados del estudio durante la fase latente de la infección permiten concluir que la presencia de partículas virales de HSV-1 inducen, al igual que durante la fase aguda, neuroinflamación, daño oxidativo y astrogliosis. Por último, la ausencia de marcadores de neurodegeneración en los animales sin infectar, confirma la relación del HSV-1 con los cambios patológicos descritos en el presente trabajo. La figura R.40. muestra imágenes representativas de los principales resultados obtenidos del estudio de la neurodegeneración.

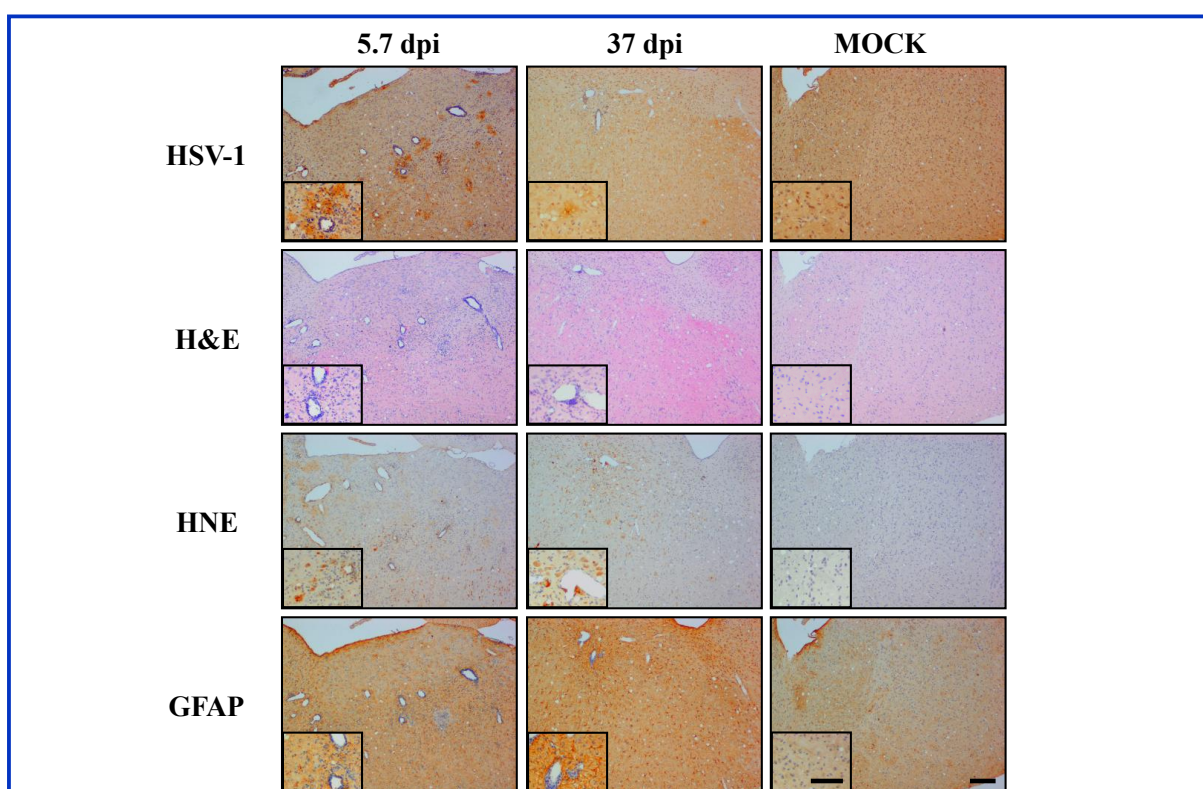


Figura R.40. Estudio de la neurodegeneración asociada a la infección por HSV-1 en ratones C57BL/6 salvajes. Se muestran imágenes representativas del *mesencéfalo* de cortes contiguos del encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes durante las infecciones aguda y latente con el virus HSV-1 y de ratones control, analizados para la detección de antígenos de HSV-1, de inflamación (H&E), de daño oxidativo (HNE) y de astrogliosis (GFAP). La barra representa una longitud de 200 μm . La barra dentro del inserto representa una longitud de 100 μm .

Por su parte, del estudio del efecto de la neuroinfección en los animales *sod2 +/-* se extrajeron las mismas conclusiones que para los animales salvajes. El HSV-1 alcanza el encéfalo de los ratones infectados durante la fase aguda de la infección induciendo, como en los ratones salvajes, la aparición de neuroinflamación. En este modelo también se observó la presencia de daño oxidativo y de astrogliosis en las regiones encefálicas donde la detección de antígenos virales fue mayor. Por el contrario, y probablemente debido a que las cargas virales detectadas durante la infección aguda fueron menores en los ratones *sod2 +/-*, no se detectaron partículas virales en los animales durante la fase latente de la infección, y por tanto tampoco las marcas histopatológicas asociadas. Por último, los animales *sod2 +/-* sin infectar fueron negativos para la detección de antígenos virales y para el resto de marcadores, poniendo también de manifiesto en este modelo la asociación del HSV-1 con las alteraciones patológicas observadas en este trabajo. La figura R.41. muestra imágenes que ejemplifican los resultados obtenidos durante el estudio del efecto de la infección hematógena en los ratones *sod2 +/-*.

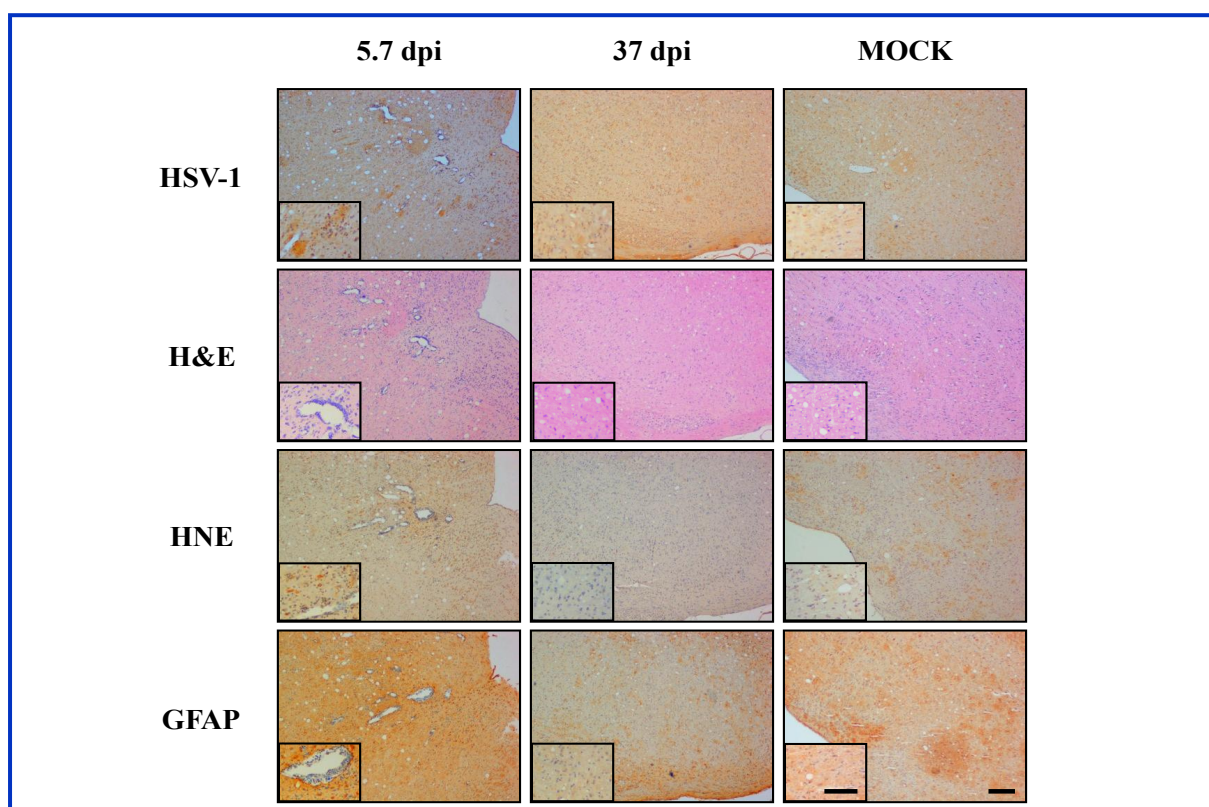


Figura R.41. Estudio de la neurodegeneración asociada a la infección por HSV-1 en ratones *sod2 +/-*. Se muestran imágenes representativas del *mesencéfalo* de cortes contiguos del encéfalo de ratones C57BL/6 *sod2 +/-* durante las infecciones aguda y latente con el virus HSV-1 y de ratones control, analizados para la detección de antígenos de HSV-1, de inflamación (H&E), de daño oxidativo (HNE) y de astrogliosis (GFAP). La barra representa una longitud de 200 μm . La barra dentro del inserto representa una longitud de 100 μm .

5.3.4.2. Estudios en ratones salvajes y en ratones *sod2* +/- infectados con HSV-1 y envejecidos de 18 meses de edad.

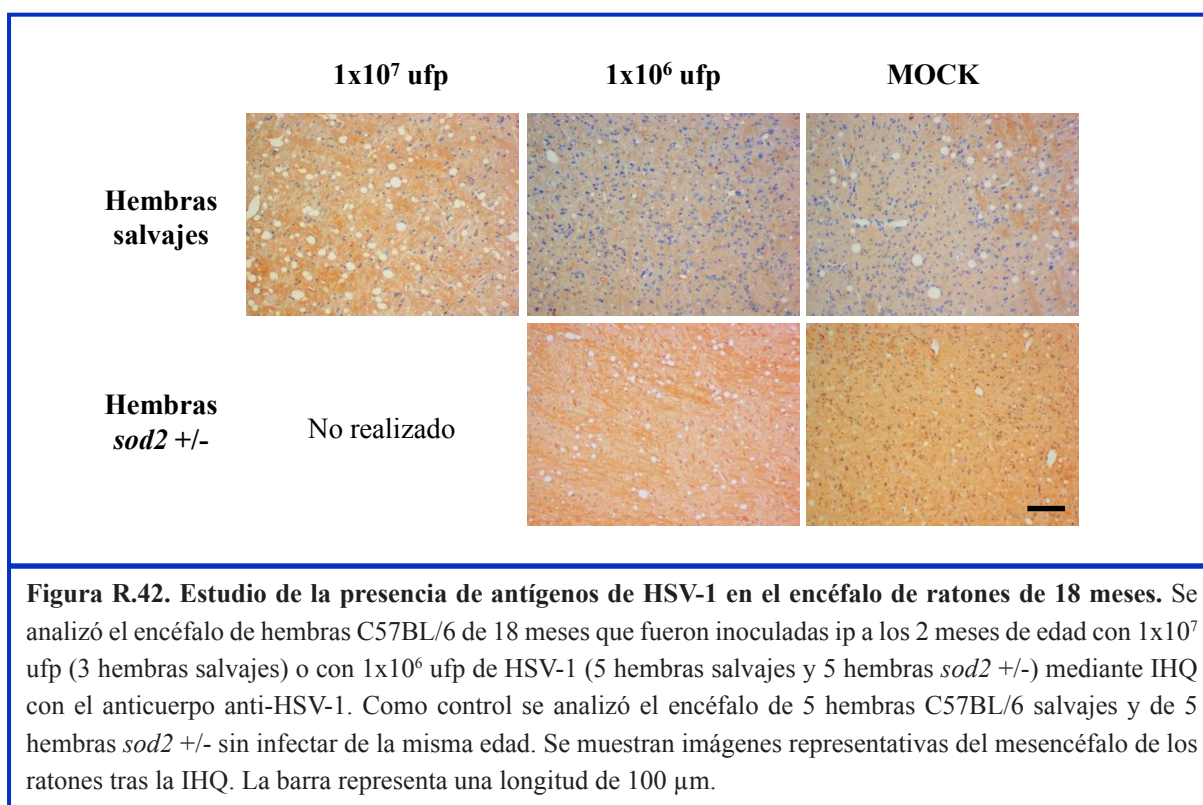
En el apartado anterior se ha demostrado que el HSV-1 invade el encéfalo de los ratones durante la infección aguda induciendo un proceso inflamatorio, daño oxidativo y astrogliosis. Además, se ha descrito la presencia de las mismas alteraciones patológicas en el encéfalo de los ratones durante la infección latente. Teniendo en cuenta que la edad avanzada es el principal factor de riesgo para la EA, el objetivo de este capítulo fue determinar los posibles procesos neurodegenerativos asociados a la infección por el HSV-1 en conjunción con el proceso normal de envejecimiento. Para ello, se realizaron estudios en ratones C57BL/6 salvajes de 18 meses, tras 16 meses de infección con HSV-1. La selección de la edad de los ratones (18 meses) pretende mimetizar los mismos fenómenos en humanos de edad avanzada. Además, para aumentar el efecto del envejecimiento se llevaron a cabo estudios en paralelo en ratones *sod2* +/- . Estos ratones tienen afectada su capacidad para eliminar radicales libres y, por lo tanto, presentan un mayor daño oxidativo, que es un aspecto característico del envejecimiento.

5.3.4.2.1. Detección de proteínas virales.

En experimentos previos, se cuantificó la carga de DNA viral en el encéfalo de los ratones infectados y envejecidos de 18 meses de edad (apartados 5.3.1. y 5.3.3.2.). Así pues, el siguiente objetivo fue estudiar la presencia de antígenos virales en dichos encéfalos para poder establecer una relación con las cargas virales y con el estado neuropatológico de los mismos. Para ello, se analizaron mediante IHQ utilizando el anticuerpo anti-HSV-1 cortes del encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- de 18 meses que fueron infectados ip con 1×10^6 ó 1×10^7 ufp de HSV-1 a los 2 meses de edad. Como control de los experimentos se emplearon ratones sin infectar de la misma edad.

El análisis IHQ reveló la ausencia de inmunorreactividad contra el anticuerpo anti-HSV-1 en el encéfalo de los ratones C57BL/6 salvajes infectados con HSV-1, independientemente de la dosis viral de inoculación. La figura R.42. muestra imágenes representativas del mesencéfalo de los ratones salvajes y *sod2* +/- de 18 meses inoculados con ambas dosis de virus y que resultaron negativos para la detección de antígenos virales.

La falta de inmunorreactividad en el encéfalo de los ratones de 18 meses se correlaciona de forma estrecha con las cargas de DNA viral en el encéfalo detectadas por PCR cuantitativa a este tiempo, ya que resultaron ser significativamente más bajas que las detectadas en el encéfalo de los ratones a 5.7 dpi, en los que sí se detectaban antígenos virales de forma abundante. No obstante, los niveles de DNA viral presentes en el encéfalo de los ratones de 18 meses son



estadísticamente comparables a los detectados en los animales jóvenes analizados a los 37 dpi (donde sí se detectaron antígenos virales), por lo que la relación carga de DNA viral en el encéfalo y detección de antígenos virales no es directa. Sin embargo, sí hay una relación entre la detección de antígenos virales en el encéfalo y los niveles de DNA viral en la sangre. Tanto los ratones analizados a 5.7 dpi como los analizados a 37 dpi presentaron niveles de DNA viral en la sangre detectables y antígenos virales en el encéfalo. Por el contrario, en los animales de 18 meses tras 16 meses de infección no se detectó DNA de HSV-1 en la sangre y tampoco inmunorreactividad contra el HSV-1 en el encéfalo. Este hecho se puede explicar en base al elevado tiempo transcurrido entre la primoinfección y el análisis (16 meses), por lo que los restos de partículas virales procedentes de la infección primaria podrían haber sido eliminados de la sangre y del encéfalo. Otra de las posibilidades es una menor tasa de reactivación previa al sacrificio de los animales.

Por su parte, los ratones *sod2* +/- de 18 meses mostraron la misma falta de inmunorreactividad contra el HSV-1 que los ratones salvajes (figura R.43.). En este caso tampoco se puede explicar la ausencia de detección de antígenos virales por el análisis de las cargas de DNA viral presentes en el encéfalo de los ratones, ya que en los animales *sod2* +/- de 18 meses los niveles de DNA de HSV-1 fueron aproximadamente 10 veces más altos que los detectados en los *sod2* +/- de 2 meses durante la infección aguda en los que se detectaron

partículas virales por IHQ. Sin embargo, en los ratones *sod2* +/- de 18 meses no se detectó DNA viral en la sangre y sí en los *sod2* +/- de 2 meses analizados a los 5.7 dpi. De igual modo que lo que ocurre en ratones salvajes, no existe inmunorreactividad contra el HSV-1 en el encéfalo de los ratones *sod2* +/- de 18 meses, probablemente por falta de procesos de reactivación previos al sacrificio de los animales, lo que se traduce en la ausencia de detección de DNA viral en la sangre y de antígenos virales en el encéfalo.

En resumen, los cortes del encéfalo de los ratones de 18 meses no presentaron inmunorreactividad contra el HSV-1, a pesar de que las cargas de DNA viral detectadas en el encéfalo a este tiempo son comparables a las que presentan los ratones salvajes a 37 dpi (en los que sí se detectaron partículas virales), o incluso mayores que las detectadas a 5.7 dpi en el caso de los ratones *sod2* +/- . Este resultado indica que la detección del HSV-1 mediante IHQ no depende exclusivamente de la carga viral presente en el encéfalo, y sí del estado en que se encuentre el virus. Además, el hecho de que a 37 dpi se detectaran partículas virales en el encéfalo de los ratones salvajes y de que los niveles de DNA viral aumenten durante el envejecimiento, sugiere que tras la entrada en la latencia se pueden producir reactivaciones puntuales a lo largo del tiempo.

5.3.4.2.2. Estudio de la neuroinflamación.

Según resultados previos presentados en este trabajo, existe un fenómeno de neuroinflamación asociado a la infección por HSV-1. Aunque en el encéfalo de ratones infectados de 18 meses no se detectaron partículas virales, sí se observaron elevadas cargas de DNA viral en el encéfalo a este tiempo, por lo que se realizaron estudios para determinar la potencial neuroinflamación. Para ello, se analizaron mediante tinción con H&E cortes del encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- de 18 meses infectados con HSV-1 y cortes de encéfalos de ratones sin infectar. En la figura R.43. se muestran imágenes representativas de diferentes regiones encefálicas para cada una de las condiciones estudiadas.

El análisis de los cortes encefálicos teñidos con H&E reveló una arquitectura neuronal normal y la ausencia generalizada de focos de inflamación en los ratones C57BL/6 salvajes de 18 meses. En los animales infectados con 1×10^7 ufp de HSV-1 tan sólo se detectaron infiltrados perivasculares en la médula oblonga. Por su parte, los ratones salvajes de 18 meses inoculados con 1×10^6 ufp de HSV-1 presentaron infiltrados difusos en el hipotálamo y en la médula oblonga. Por último, los ratones C57BL/6 mock mostraron, al igual que los ratones infectados con 1×10^6 ufp de HSV-1, infiltrados en el hipotálamo y en la médula oblonga, indicando que el HSV-1 no induce un aumento significativo de la neuroinflamación en los ratones infectados a esta edad.

Por su parte, los encéfalos de los ratones *sod2* +/- de 18 meses también mostraron una morfología encefálica normal. De forma detallada, el estudio de los cortes histológicos teñidos con H&E del encéfalo de los animales *sod2* +/- inoculados con 1×10^6 ufp de HSV-1 mostró inflamación en más regiones encefálicas que los animales salvajes. Se detectó inflamación en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga. Los ratones *sod2* +/- sin infectar de 18 meses, a su vez, mostraron infiltrados difusos en un mayor número de áreas encefálicas que los ratones salvajes mock de la misma edad. Además, los ratones *sod2* +/- sin infectar presentaron inflamación en las mismas regiones encefálicas que los ratones *sod2* +/- infectados, es decir, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga. En este caso, tampoco se observa un incremento en la extensión o en la intensidad de la neuroinflamación debido a la infección. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para los ratones *sod2* +/- sin infectar de 18 meses con respecto a los ratones *sod2* +/- mock de 2 meses, se desprende que el envejecimiento implica una diseminación de la inflamación por todo el encéfalo. A su vez, cuando se comparan las imágenes de la neuroinflamación de los ratones de 18 meses sin infectar *sod2* +/- y salvajes, se observa que la deficiencia parcial en el gen *sod2* asociada al envejecimiento influye en el proceso neuroinflamatorio, pues los ratones *sod2* +/- presentan inflamación en un mayor número de regiones encefálicas que los ratones salvajes.

El estudio IHQ también permitió realizar un análisis cuantitativo de la neuroinflamación. En la tabla R.10. se indica el número de animales que presentaron inflamación en cada una de las regiones en que se dividió el encéfalo.

Los ratones C57BL/6 salvajes de 18 meses infectados con la dosis viral más alta presentaron inflamación sólo en la médula oblonga de una de las tres hembras estudiadas. El resto de regiones (corteza, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo y cerebelo) fueron negativas para la inflamación en los tres animales analizados. Por su parte, los ratones salvajes inoculados con 1×10^6 ufp presentaron inflamación en el hipotálamo en un animal de cinco analizados y en la médula oblonga también en un animal de cinco estudiados. Por último, los ratones salvajes mock de 18 meses también mostraron inflamación en un animal de cinco analizados en el hipotálamo y en dos animales de cinco estudiados en la médula oblonga. En resumen, el análisis cuantitativo corrobora la tendencia descrita en el análisis de las imágenes, mostrando que la neuroinflamación es minoritaria en los ratones salvajes de 18 meses y que la infección a este tiempo no potencia la inflamación basal.

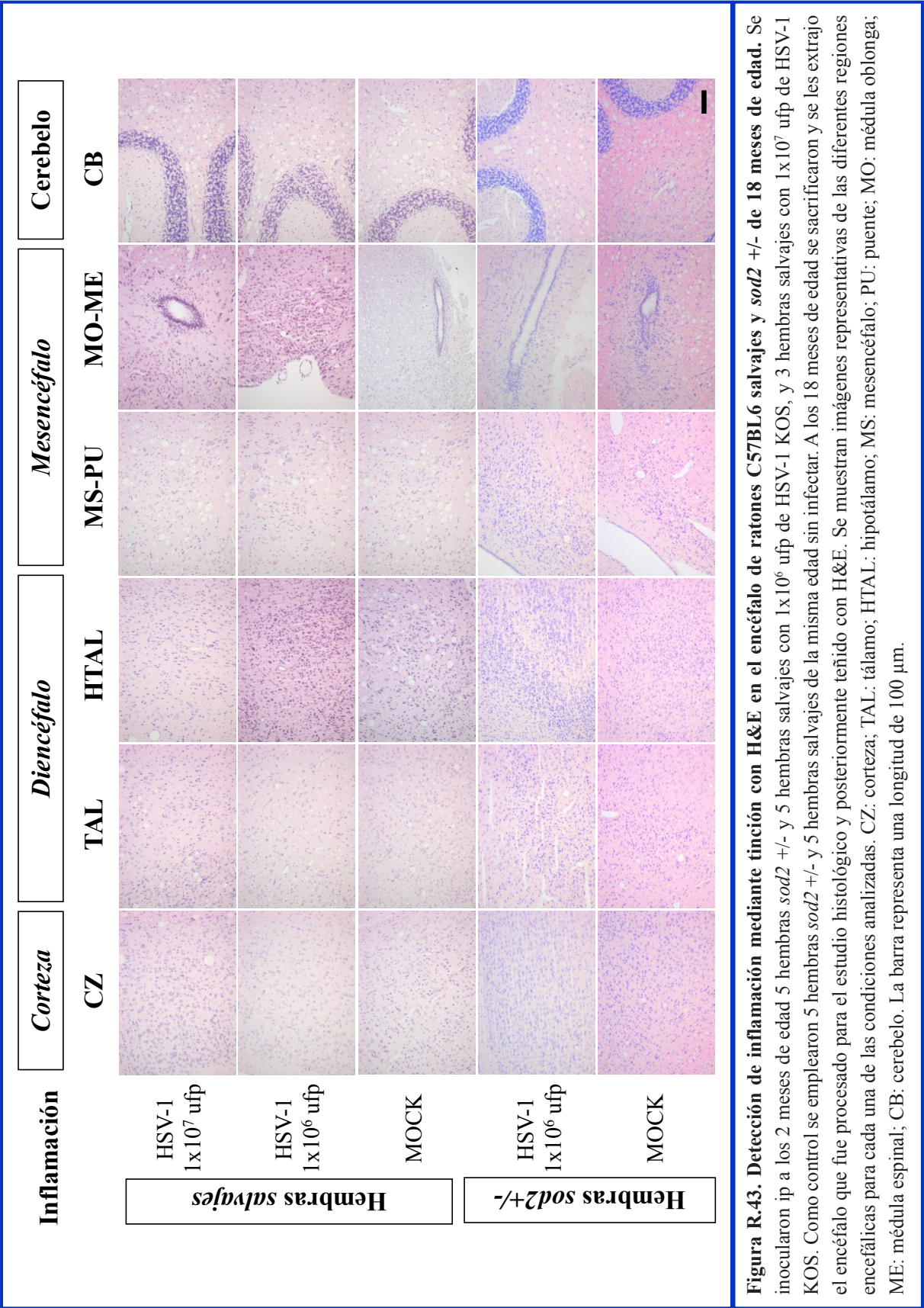


Figura R.43. Detección de inflamación mediante tinción con H&E en el encéfalo de ratones C57BL6 salvajes y *sod2* +/- de 18 meses de edad. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 5 hembras *sod2* +/- y 5 hembras salvajes con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS, y 3 hembras salvajes con 1×10^7 ufp de HSV-1 KOS. Como control se emplearon 5 hembras *sod2* +/- y 5 hembras salvajes de la misma edad sin infectar. A los 18 meses de edad se sacrificaron y se les extrajo el encéfalo que fue procesado para el estudio histológico y posteriormente teñido con H&E. Se muestran imágenes representativas de las diferentes regiones encefálicas para cada una de las condiciones analizadas. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo. La barra representa una longitud de 100 μ m.

Neuroinflamación		Corteza	Diencefalo		Mesencéfalo		Cerebelo
		CZ	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 1x10 ⁷ ufp	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5	0/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	0/5	1/5	2/5	2/5	2/5	0/5
	MOCK	0/5	1/5	2/5	1/5	2/5	0/5

Tabla R.10. Relación del número de animales de 18 meses que presentan neuroinflamación con respecto al total de animales estudiados mediante el análisis de cortes encefálicos teñidos con H&E. Se inocularon ip a los 2 meses de edad 8 hembras salvajes con 1x10⁶ ó 1x10⁷ ufp y 5 hembras *sod2* +/- con 1x10⁶ ufp de HSV-1 y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad se sacrificaron y se analizó el encéfalo para determinar la inflamación mediante tinción con H&E. Se emplearon 5 hembras salvajes y 5 hembras *sod2* +/- sin infectar de la misma edad como controles. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

El número de ratones *sod2* +/- infectados de 18 meses con inflamación en el encéfalo fue mayor que el de animales salvajes infectados de la misma edad. Además, en los ratones *sod2* +/- se detectó inflamación en más regiones encefálicas. De forma detallada, se detectó inflamación en el tálamo en un ratón de cinco analizados y en el hipotálamo, en el mesencéfalo y en la médula oblonga en dos de cinco animales. Por su parte, los ratones *sod2* +/- sin infectar de la misma edad presentaron el mismo patrón de neuroinflamación que los infectados. En estos animales se detectó inflamación en el tálamo y en el mesencéfalo en un caso y en el hipotálamo y en la médula oblonga en dos de cinco ratones *sod2* +/- . La semejanza en el número de regiones encefálicas afectadas por la inflamación entre los animales *sod2* +/- infectados de 18 meses y los animales mock de la misma edad indica, como en el caso de los ratones salvajes, que la infección por HSV-1 no influye en la neuroinflamación presentada en los ratones a este tiempo. Además, al comparar los datos obtenidos para los ratones *sod2* +/- de 18 meses con los de los ratones salvajes de la misma edad, se observa que la deficiencia parcial en el gen *sod2* asociada al envejecimiento implica un aumento en la neuroinflamación.

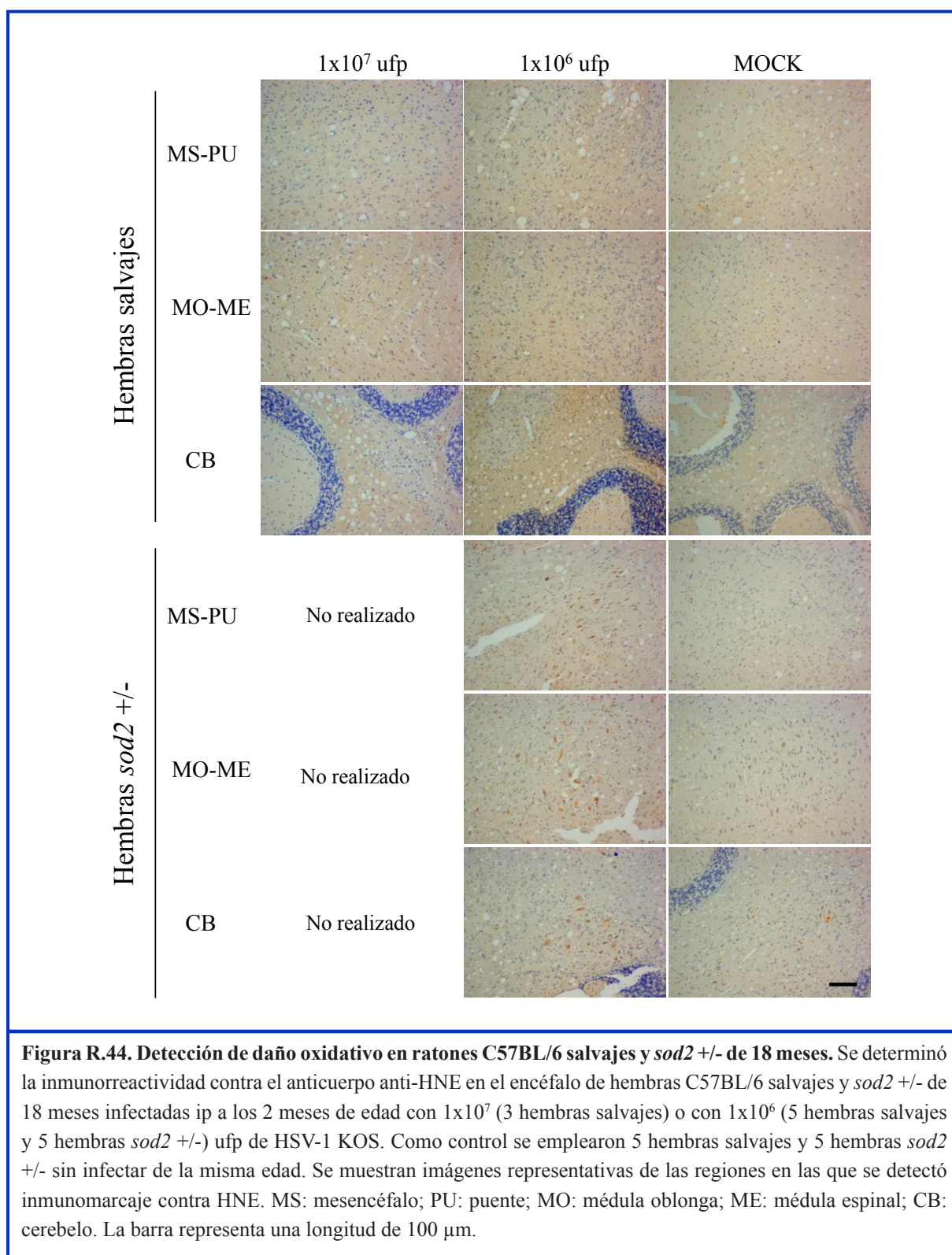
En conclusión, estos resultados indican que la infección por HSV-1 asociada al envejecimiento no produce un aumento significativo de la neuroinflamación, y que la deficiencia parcial en el gen *sod2* confiere a estos ratones una mayor neuroinflamación asociada a la edad que los ratones salvajes.

5.3.4.2.3. Detección de daño oxidativo.

En apartados anteriores se ha descrito que los animales de 18 meses infectados con HSV-1 a los 2 meses de edad presentan elevadas cargas de DNA viral en el encéfalo (en el caso de los *sod2* +/- más altas incluso que las detectadas a 5.7 dpi), y que los niveles de DNA viral en el encéfalo aumentan con el tiempo. Así pues, a pesar de que no se detectaron antígenos virales en el encéfalo de los ratones de 18 meses, existen indicios para pensar que se podrían producir reactivaciones virales puntuales que pudieran generar daño oxidativo en el encéfalo. Con el objetivo de detectar el posible daño oxidativo asociado a la infección con HSV-1, se analizó el encéfalo de ratones C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- de 18 meses de edad tras 16 meses de infección, mediante el uso del anticuerpo anti-HNE que reconoce un subproducto de la oxidación de los lípidos.

El estudio del encéfalo de los ratones salvajes infectados con 1×10^7 ufp o con 1×10^6 ufp de HSV-1 fue negativo para la detección de daño oxidativo mediante IHQ con el anticuerpo anti-HNE. La figura R.44. muestra imágenes representativas de dicho estudio. Los ratones control fueron igualmente negativos para dicha reacción, indicando que ni el HSV-1 ni el envejecimiento generan un daño oxidativo suficiente para ser detectado mediante IHQ contra el HNE en los ratones salvajes de esta edad. Sin embargo, el encéfalo de los ratones *sod2* +/- de 18 meses infectados con HSV-1 presentaron inmunorreactividad contra el HNE exclusivamente en el mesencéfalo, en la médula oblonga y en el cerebelo. Por su parte, los ratones *sod2* +/- mock también presentaron marcaje contra el HNE en la médula oblonga y en el cerebelo, aunque en un menor número de células y de forma menos intensa que la detectada en los ratones infectados.

Los resultados obtenidos para los ratones *sod2* +/- muestran que la deficiencia parcial en dicho gen, unida al envejecimiento, genera daño oxidativo en el encéfalo que se ve incrementado por efecto de la infección.



A partir del análisis IHQ, se estudió el número de animales que presentaron inmunorreactividad contra el HNE en cada una de las regiones en que dividimos el encéfalo de los ratones (tabla R.11.). Como ha quedado reflejado previamente, ningún ratón C57BL/6 salvaje de 18 meses de edad (infectado o control) mostró marcaje contra el HNE. En los ratones *sod2* +/-, por el contrario, se detectó inmunorreactividad contra el HNE en el mesencéfalo y en el cerebelo en un animal y en la médula oblonga en dos animales de un total de cinco analizados. Tanto el mesencéfalo como la médula oblonga fueron dos de las regiones encefálicas que presentaron neuroinflamación en los animales de 18 meses, lo que concuerda con las altas cargas de DNA viral determinadas por PCR cuantitativa a este tiempo. Por su parte, los ratones *sod2* +/- mock presentaron marcaje contra el HNE en la médula oblonga y en el cerebelo en un animal de cinco estudiados, mientras que los animales *sod2* +/- infectados mostraron marcaje en un mayor número de regiones y de animales.

Daño oxidativo		Corteza	Diencefalo		Mesencefalo		Cerebelo
		CZ	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 1x10 ⁷ ufp	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5	1/5
	MOCK	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5

Tabla R.11. Relación del número de animales de 18 meses que presentan daño oxidativo en el encéfalo mediante inmunomarcaje contra HNE con respecto al total de animales estudiados durante la infección con HSV-1. Se inocularon ip a los 2 meses de edad hembras salvajes con 1x10⁶ ó 1x10⁷ ufp y hembras *sod2* +/- con 1x10⁶ ufp de HSV-1 y se dejaron envejecer. A los 18 meses de edad se sacrificaron 3 hembras salvajes inoculadas con 1x10⁷ ufp, 5 hembras salvajes inoculadas con 1x10⁶ ufp y 5 hembras *sod2* +/- inoculadas con 1x10⁶ ufp de HSV-1, así como 5 hembras sin infectar de la misma edad de cada condición, y se analizaron los encéfalos mediante IHQ con el anticuerpo anti-HNE para determinar el daño oxidativo en las diferentes regiones encefálicas. CZ: corteza; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

En resumen, los resultados obtenidos indican que ni el envejecimiento ni la infección con HSV-1 asociada al envejecimiento inducen daño oxidativo en el encéfalo de los ratones salvajes en el modelo de envejecimiento normal. Sin embargo, en el modelo de envejecimiento acelerado en los ratones *sod2* +/-, se observa un leve incremento del daño oxidativo por efecto de la infección con HSV-1.

5.3.4.2.4. Detección de astrogliosis.

Con el objetivo de caracterizar en más profundidad el efecto de la infección asociada al envejecimiento, se estudió la presencia de astrocitos en el encéfalo de los ratones infectados y de los ratones control de 18 meses, tanto en los ratones C57BL/6 salvajes como en los ratones *sod2* +/-.

Los resultados neurohistológicos indican que los ratones de 18 meses presentan una mayor inmunorreactividad contra la proteína GFAP que los ratones de 2 meses (figura R.45.). En los ratones envejecidos, además de detectarse una proliferación de los astrocitos en el hipocampo, en el cuerpo caloso, en la fimbria del hipocampo, en el fornix y en el bulbo olfatorio, se detectaron también de forma constante e intensa en el resto de regiones encefálicas, siendo la corteza la región donde se observó un menor número de astrocitos.

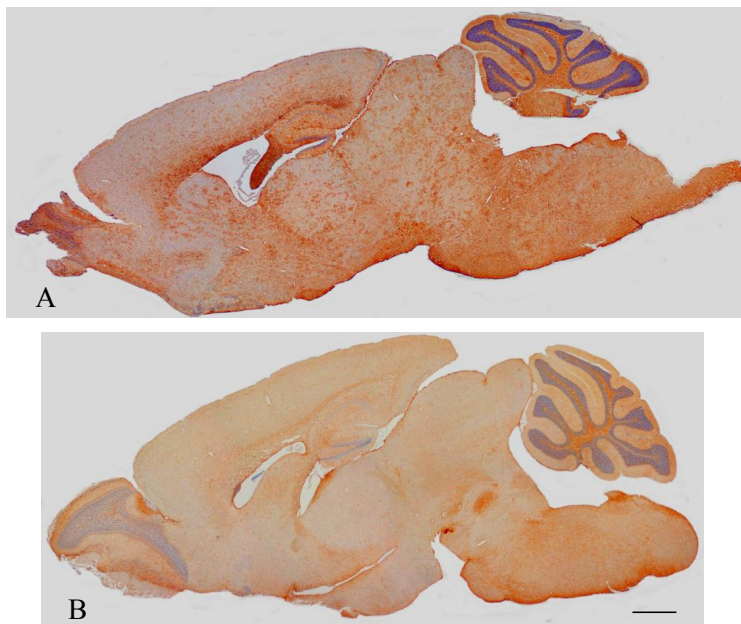
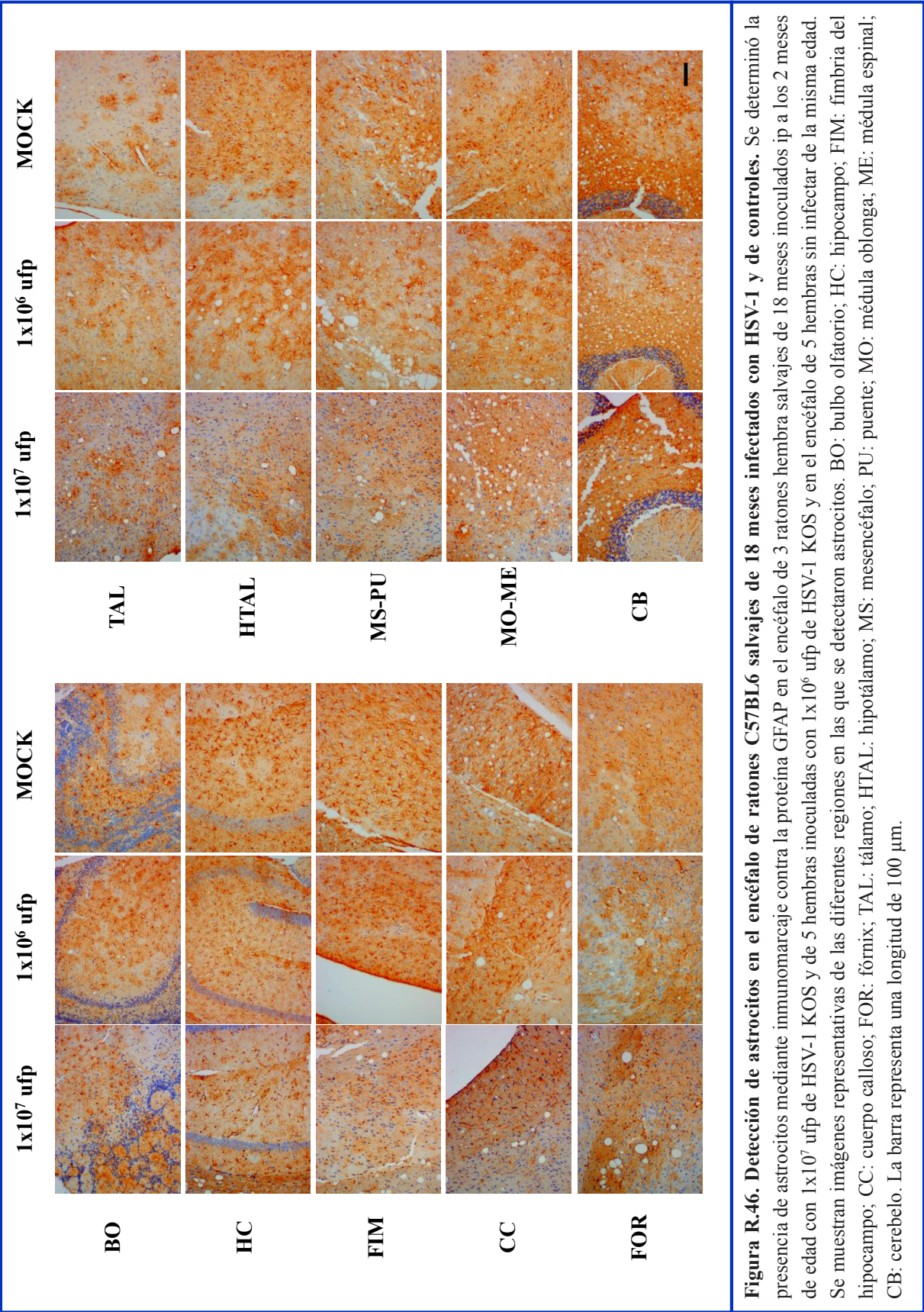
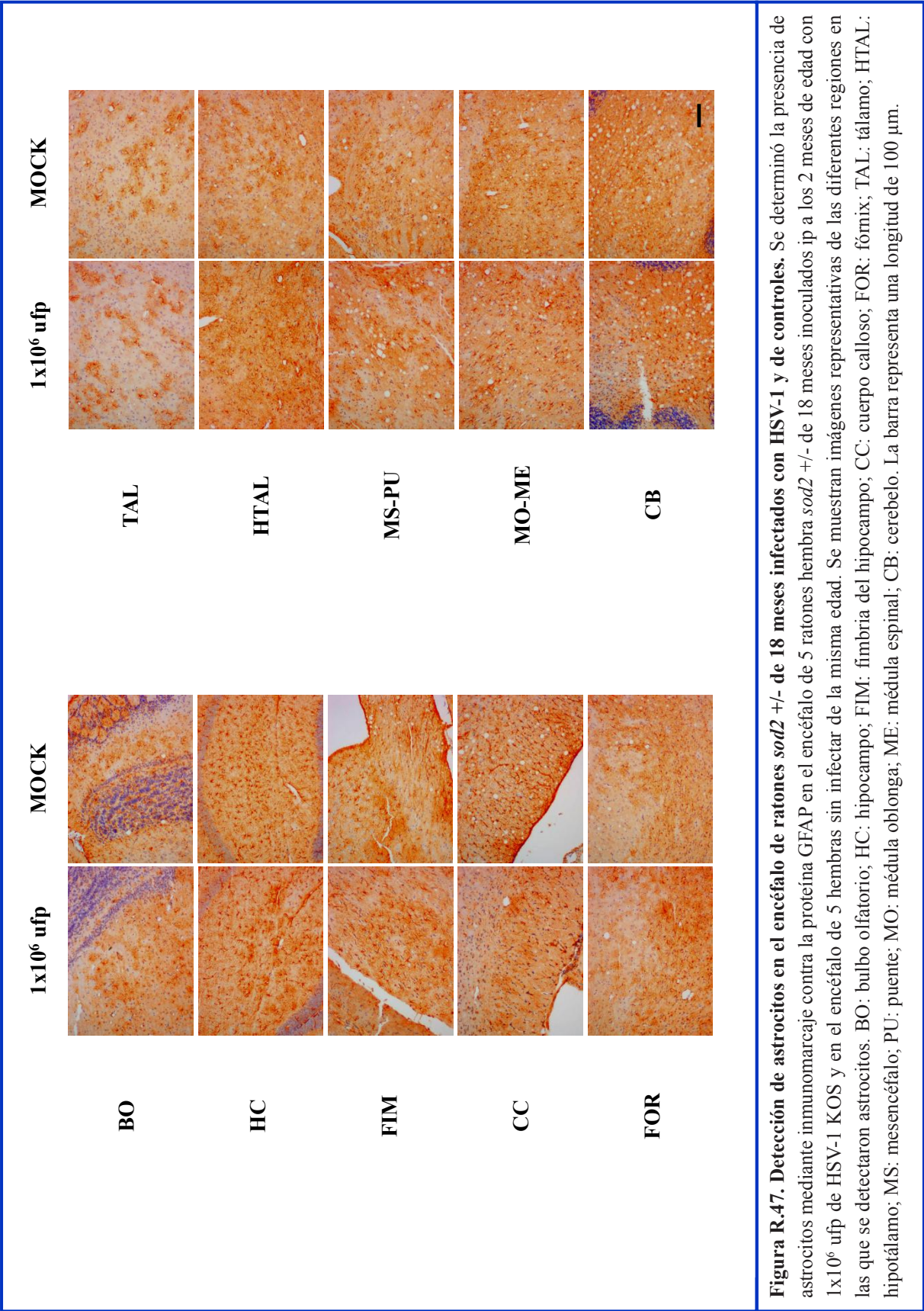


Figura R.45. Vistas sagitales del encéfalo de dos ratones sin infectar teñidas contra la proteína GFAP. (A) Imagen representativa de un ratón salvaje de 18 meses mostrando inmunorreactividad contra la proteína GFAP en todas las regiones encefálicas. (B) Imagen de un ratón salvaje de 2 meses. La barra representa una longitud de 1 mm.

El análisis detallado del encéfalo de los ratones salvajes de 18 meses infectados con 1×10^7 ufp tras la IHQ reveló la presencia de astrocitos de forma constante e intensa en todas las regiones encefálicas. La figura R.46. muestra imágenes representativas de astrocitos en el bulbo olfatorio, en el hipocampo, en la fimbria del hipocampo, en el cuerpo calloso, en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo, en la médula oblonga y en el cerebelo para las tres condiciones experimentales estudiadas en los ratones salvajes. Por su parte, las hembras salvajes de la misma edad inoculadas con 1×10^6 ufp mostraron astrocitos en igual número y tamaño y en las mismas regiones encefálicas que los presentados por los ratones inoculados con 1×10^7 ufp. Al comparar los resultados obtenidos para los ratones de 18 meses infectados con 1×10^6 ufp (figura R.46.) con los obtenidos para los animales infectados con igual dosis viral de 2 meses (figura R.38.), se observa (de forma análoga a lo reflejado en la figura R.45.) un incremento en el tamaño y en el número de los astrocitos, al igual que una distribución más extensa de los mismos, en los ratones de 18 meses y que resulta más notable en el tálamo, en el hipotálamo, en el mesencéfalo, en la médula oblonga y en el cerebelo. Por último, los ratones mock de 18 meses presentaron un marcaje astrocítico similar a los ratones infectados con HSV-1, lo que indica que la astrogliosis observada se debe fundamentalmente al efecto del envejecimiento y no a la infección.

Por su parte, el análisis IHQ contra la proteína GFAP de los ratones *sod2* +/- de 18 meses infectados con 1×10^6 ufp mostró astrocitos al igual que en los ratones salvajes de forma numerosa en todas las regiones encefálicas (figura R.47.). Los ratones *sod2* +/- mock de 18 meses también presentaron numerosos astrocitos en todas las regiones encefálicas de manera comparable a la detectada para los ratones infectados de la misma edad, indicando que a este tiempo el HSV-1 no incrementa la astrogliosis detectada. Al comparar los resultados obtenidos para los animales *sod2* +/- de 18 meses (figura R.47.) con los obtenidos en los animales *sod2* +/- de 2 meses (figura R.39.), se observa un aumento en la astrogliosis producto del envejecimiento tanto en los animales infectados como en los animales mock. Además, la comparación de la astrogliosis presente en los animales salvajes y *sod2* +/- de 18 meses (figuras R.46. y R.47.), muestra que los ratones *sod2* +/- presentan una astrogliosis más intensa que los ratones salvajes.





Por otra parte, el análisis cuantitativo de las imágenes mostró, de forma evidente, la inducción de la astrogliosis durante el envejecimiento, ya que todas las regiones encefálicas de todos los ratones de 18 meses presentaron marca astrocítica (tabla R.12.).

Astrogliosis		Corteza				Diencefalo			Mesencefalo		Cerebelo
		BO	HC	FIM	CC	FOR	TAL	HTAL	MS-PU	MO-ME	CB
Hembras salvajes	HSV-1 1x10 ⁷ ufp	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	MOCK	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Hembras <i>sod2</i> +/-	HSV-1 1x10 ⁶ ufp	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	MOCK	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

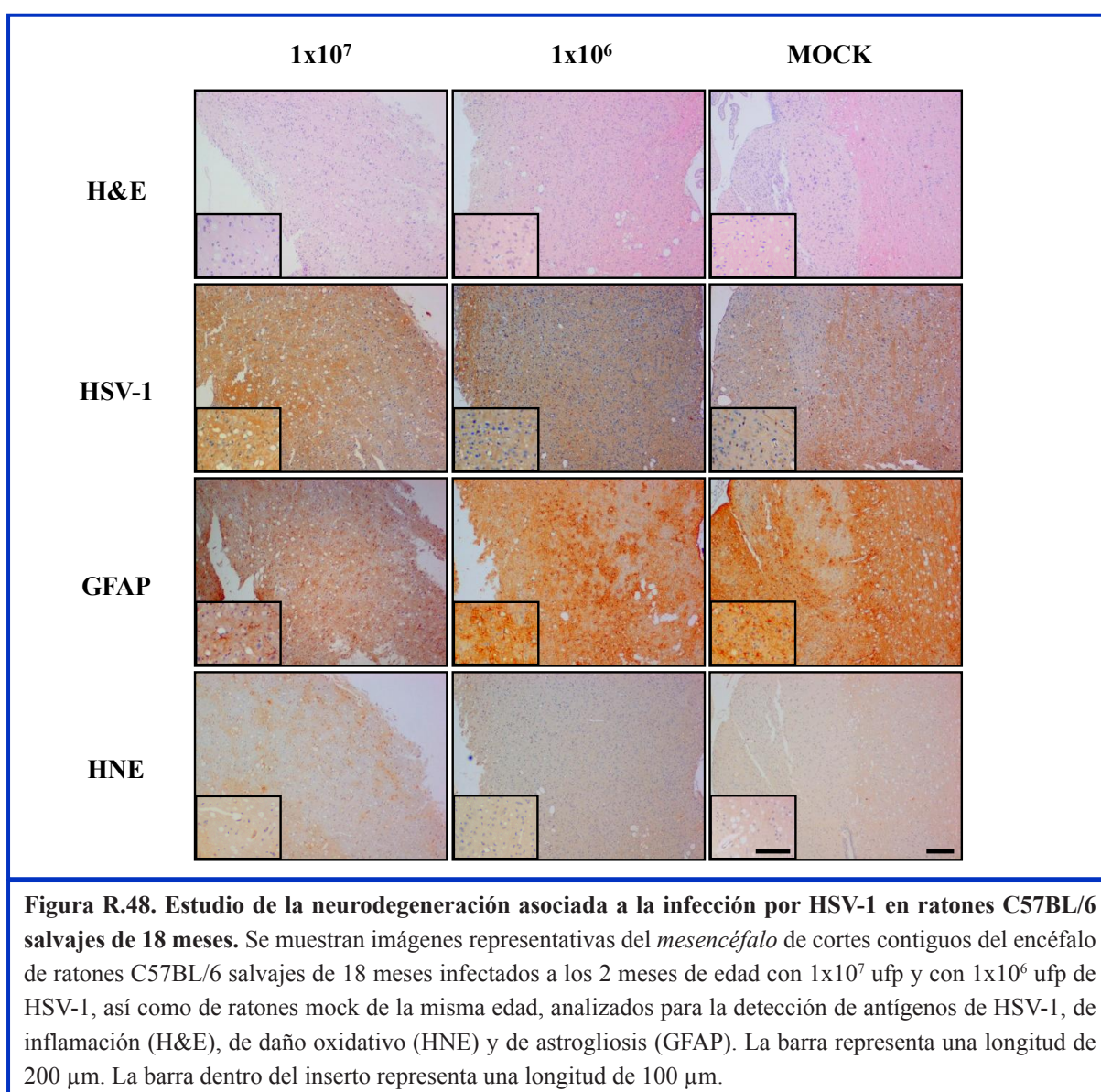
Tabla R.12. Relación del número de ratones de 18 meses que presentan inmunomarcaje contra GFAP con respecto al total de ratones estudiados durante la infección con HSV-1. Se utilizó un anticuerpo anti-GFAP para estudiar la presencia de astrocitos en el encéfalo de hembras de 18 meses C57BL/6 salvajes y *sod2* +/- inoculadas ip a los 2 meses de edad con 1x10⁷ ó 1x10⁶ ufp de HSV-1. Se utilizaron hembras sin infectar de ambos grupos como controles. BO: bulbo olfatorio; HC: hipocampo; FIM: fimbria del hipocampo; CC: cuerpo calloso; FOR: fórnix; TAL: tálamo; HTAL: hipotálamo; MS: mesencéfalo; PU: puente; MO: médula oblonga; ME: médula espinal; CB: cerebelo.

Estos resultados indican que el envejecimiento es la principal causa de astrogliosis y que el HSV-1 no potencia el número ni la distribución de los astrocitos en los ratones envejecidos. Además, estos resultados sugieren que la deficiencia parcial en el gen *sod2* en los ratones de 18 meses les otorga una mayor astrogliosis.

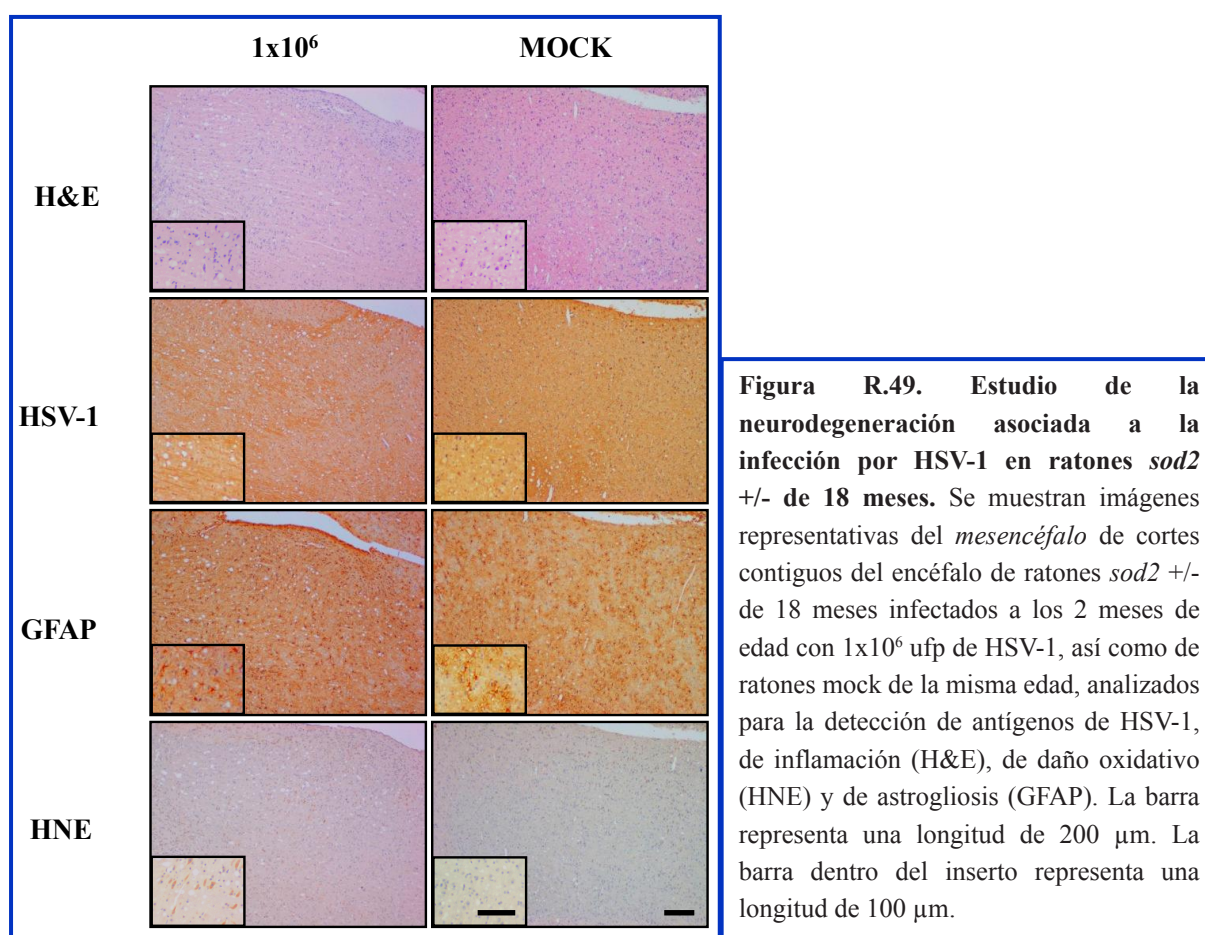
Resumen de los estudios neuropatológicos realizados en ratones infectados con HSV-1 y envejecidos de 18 meses de edad.

El estudio de la neuroinfección por HSV-1 asociada al envejecimiento reveló una ausencia de detección de antígenos virales. Por su parte, el análisis de la neuroinflamación mostró áreas difusas de inflamación no asociadas a la infección en un número reducido de

animales. En relación a la presencia de daño oxidativo en el encéfalo de los ratones envejecidos, no se detectaron marcadores de daño oxidativo de forma evidente ni en los ratones infectados ni en los controles. Por último, el encéfalo de los animales presentó astrogliosis de manera constante en todas las regiones analizadas independientemente de la infección. La figura R.48. muestra imágenes representativas del efecto de la neuroinfección con el envejecimiento en los ratones salvajes.



Por su parte, el análisis del efecto de la neuroinfección por HSV-1 asociada al envejecimiento en los ratones *sod2* +/- de 18 meses no permitió, al igual que lo descrito en los ratones salvajes, la detección de antígenos virales en el encéfalo. Nuevamente, en estos ratones tampoco se observó un aumento de la neuroinflamación por efecto de la infección, pero sí un aumento de la misma con respecto a los salvajes. Sin embargo, en los ratones *sod2* +/-, a diferencia de lo observado en los animales salvajes, se detectó daño oxidativo en el encéfalo en mayor cantidad en los animales infectados. Por último, al igual que en los ratones salvajes, los animales *sod2* +/- presentaron astrogliosis en todas las regiones encefálicas de forma independiente de la infección, aunque los animales *sod2* +/- mostraron astrogliosis de manera más intensa que los animales salvajes. La figura R.49. muestra imágenes que ejemplifican los resultados obtenidos durante el estudio de la neuroinfección en los ratones *sod2* +/-.



En resumen, los estudios neuropatológicos descritos aquí sugieren que el HSV-1 induce una fuerte reacción inflamatoria durante la infección aguda, así como astrogliosis y daño oxidativo en las regiones encefálicas donde la detección de antígenos virales es mayor. Además, también se detectan alteraciones patológicas durante la fase latente de la infección (neuroinflamación, daño oxidativo y astrogliosis), las cuales pueden ser debidas a reactivaciones puntuales del HSV-1.

Por otra parte, los experimentos desarrollados en ratones salvajes infectados y envejecidos de 18 meses reflejan alteraciones neuropatológicas discretas, tanto en los ratones infectados como en los controles, lo que puede indicar que el envejecimiento es el responsable de los cambios neuropatológicos observados. Además, el análisis de los ratones *sod2* +/- indica que el déficit en el gen *sod2*, potencia los efectos del envejecimiento y de la infección.

La Tabla R.13. muestra un resumen de las principales alteraciones neuropatológicas detectadas en el encéfalo de los ratones asociadas a la infección por HSV-1 y al envejecimiento.

Fondo genético (edad)	Dosis viral inoculación (ufp)	Tiempo post-infección	DNA viral (PCR) Genomas virales	Antígenos virales (HSV-1)	Neuroinflamación (H&E)	Daño oxidativo (HNE)	Astrogliosis (GFAP)
Hembras salvajes (2 meses)	1x10 ⁶	5.7 dpi	≈ 5x10 ⁵	++++	++++	+++	+++
		37 dpi	≈ 5x10 ⁴	+	+	+	+
	MOCK		0	–	+ / –	–	+ / –
Hembras <i>sod2</i> +/- (2 meses)	1x10 ⁶	5.7 dpi	≈ 5x10 ³	+++	+++	+++	++
		37 dpi	No realizado	–	+ / –	–	+
	MOCK		0	–	+ / –	+	+ / –
Hembras salvajes (18 meses)	1x10 ⁷	16 mpi	≈ 1x10 ⁴	–	+ / –	–	++++
	1x10 ⁶		≈ 1x10 ⁴	–	+ / –	–	++++
	MOCK		0	–	+ / –	–	++++
Hembras <i>sod2</i> +/- (18 meses)	1x10 ⁶	16 mpi	≈ 1x10 ⁴	–	+	++	++++
	MOCK		0	–	+	+	++++

Tabla R.13. Resumen de las principales alteraciones patológicas detectadas en el encéfalo de los ratones.

++++ : alteraciones muy intensas por todo el encéfalo; +++ : alteraciones muy intensas localizadas;

++ : alteraciones intensas; + : alteraciones moderadas; + / – : alteraciones leves; – : ausencia de alteraciones.

En conclusión, el HSV-1 desencadena una fuerte respuesta inflamatoria, astrogliosis y daño oxidativo en el encéfalo de los ratones durante la fase aguda de la infección, y ligeras alteraciones patológicas durante la fase latente. Además, los resultados obtenidos presentan a los ratones *sod2* +/- como un modelo idóneo para la realización de estudios de envejecimiento.

5.3.5. Estudios *in vivo* del encéfalo de ratones infectados con HSV-1 mediante resonancia magnética de imagen y espectroscopía.

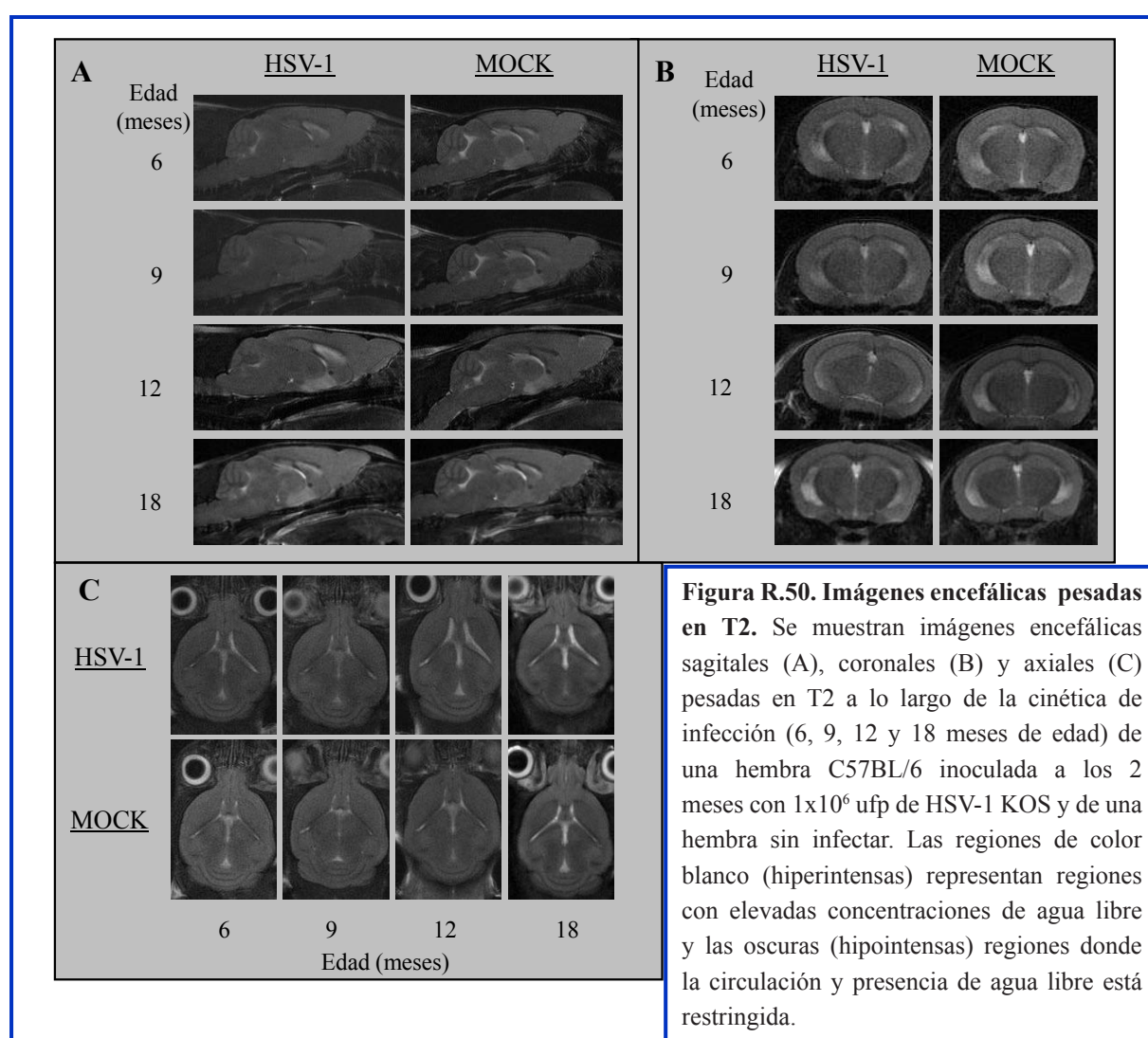
La resonancia magnética de imagen es una técnica que permite el estudio *in vivo* del encéfalo de los ratones mediante la obtención de imágenes cerebrales de alta resolución. Esta técnica posibilita, por tanto, la comparación de los cambios morfológicos del encéfalo con las alteraciones funcionales y de comportamiento asociados a una patología en el mismo ratón (Kooy y cols., 2001).

La RMI se basa en la propiedad que tienen determinados núcleos atómicos, entre ellos el del hidrógeno (^1H), de poseer un “momento magnético” y un “momento angular”, o dicho de otro modo de poseer un spin distinto de cero. En presencia de un campo magnético los spines se orientan en la dirección del campo y de forma opuesta al campo generando dos niveles de energía. Tras la aplicación de un pulso de radiofrecuencia determinado (el de la frecuencia de precesión de los núcleos) todos los spines pasan al nivel de mayor energía (se excitan), y una vez concluido dicho pulso vuelven al estado de equilibrio emitiendo la energía adquirida (proceso de relajación). El tiempo que emplean los protones en emitir la energía adquirida (tiempo de relajación T1 y T2) depende de las características del entorno y es específico para los diferentes tejidos del encéfalo, lo que permite obtener imágenes de contraste. Además, el número de protones (átomos de hidrógeno) presentes en los diferentes tejidos también afecta a la intensidad de la señal. Finalmente, el análisis de la emisión de la energía adquirida posibilita la generación, mediante procesos matemáticos (transformada de Fourier), de las imágenes de resonancia (Budinger y cols., 1999).

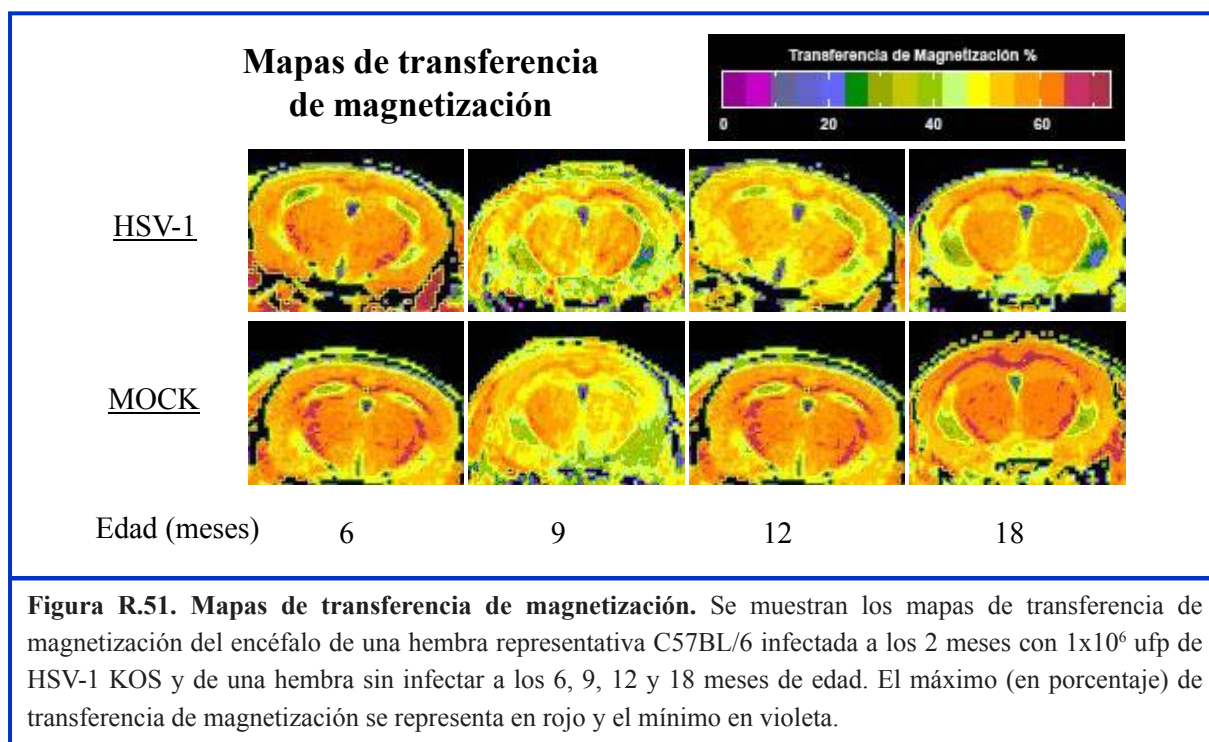
En base a estos principios, y con el fin de analizar los cambios neurológicos asociados a la infección por HSV-1 y al envejecimiento de forma longitudinal, se estudió mediante RMI a los 6, 9, 12 y 18 meses de edad un grupo de ratones C57BL/6 salvajes infectados con 1×10^6 ufp de HSV-1 a los 2 meses y un grupo de ratones control sin infectar. Para cada uno de los ratones se registraron 12 imágenes encefálicas sagitales, 10 axiales y 15 coronales pesadas en T2. Asimismo, se obtuvieron imágenes con contraste por transferencia de magnetización (8 imágenes coronales por encéfalo) para determinar los daños en las vainas de mielina. Por último, se emplearon secuencias para la realización de estudios espectroscópicos de vóxel único

para estudiar la concentración de los principales metabolitos presentes en el encéfalo.

El análisis de las imágenes encefálicas pesadas en T2 no reveló diferencias anatómicas significativas entre los 11 animales infectados y los 8 animales control, en ninguno de los puntos temporales de la cinética, ni tampoco cambios apreciables en ninguno de los grupos debidos al envejecimiento. Se presenta, como ejemplo, una figura con imágenes sagitales, coronales y axiales del encéfalo de un ratón control y de un ratón infectado a lo largo de la cinética de estudio (figura R.50.).



Asimismo, se analizaron imágenes con contraste por transferencia de magnetización (figura R.51.). Este contraste revela, de forma indirecta, daños en las vainas de mielina, ya que cuanto menor es el porcentaje de transferencia de magnetización, menor es la cantidad de mielina presente. El análisis cualitativo de estas imágenes tampoco mostró diferencias significativas entre los animales infectados y los animales mock en ninguno de los puntos temporales, ni tampoco diferencias en ninguno de los grupos analizados debidas al envejecimiento.



Además, en los mismos ratones se realizaron estudios espectroscópicos de vóxel único basados en los espectros de resonancia magnética de protones (^1H), de una región del encéfalo del ratón que comprende el hipocampo y parte de la corteza y del tálamo (ver figura MM.3.). Estos estudios permiten determinar las variaciones de los principales metabolitos presentes en el encéfalo debidas al envejecimiento y a la infección (Rudkin and Arnold, 1999). Se representan en la figura R.52. los espectros de resonancia de un ratón mock y de un ratón infectado de 18 meses de edad.

La figura R.53. muestra la relación NAA/Cre a lo largo del tiempo en los ratones infectados y en los ratones control. La NAA está presente en las neuronas y se considera un indicador de la densidad y de la salud neuronal (Dedeoglu y cols., 2004). Por su parte, la concentración de la Cre, al no variar sustancialmente, se usa como valor de referencia (Rudkin and Arnold, 1999). En la gráfica se observa que a 6, a 9 y a 12 meses la relación NAA/Cre es

mayor en los ratones control (mock) que en los ratones infectados con HSV-1. Sin embargo, en los animales de 18 meses la relación de NAA/Cre de los ratones control disminuye con respecto a la presentada en los meses anteriores y se iguala a la presentada por los ratones infectados. Este resultado sugiere que la pérdida neuronal debida al envejecimiento se encuentra acelerada como consecuencia de la infección.

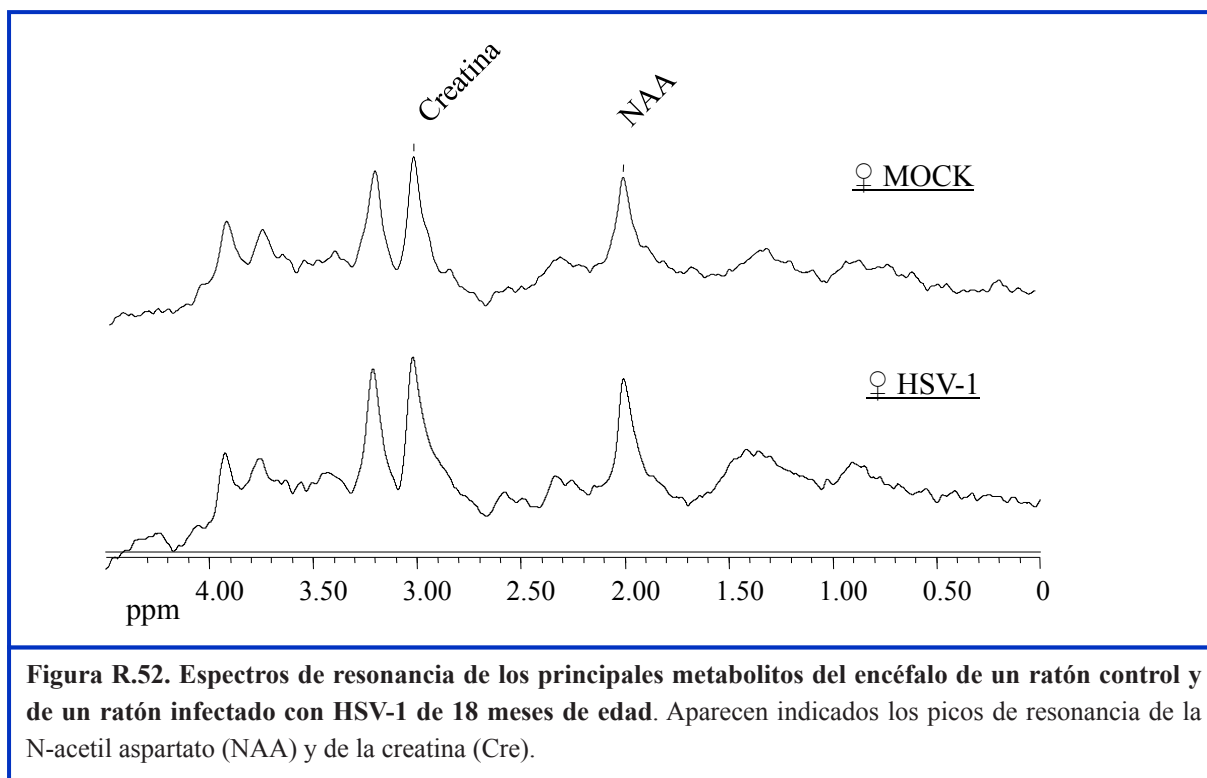


Figura R.52. Espectros de resonancia de los principales metabolitos del encéfalo de un ratón control y de un ratón infectado con HSV-1 de 18 meses de edad. Aparecen indicados los picos de resonancia de la N-acetil aspartato (NAA) y de la creatina (Cre).

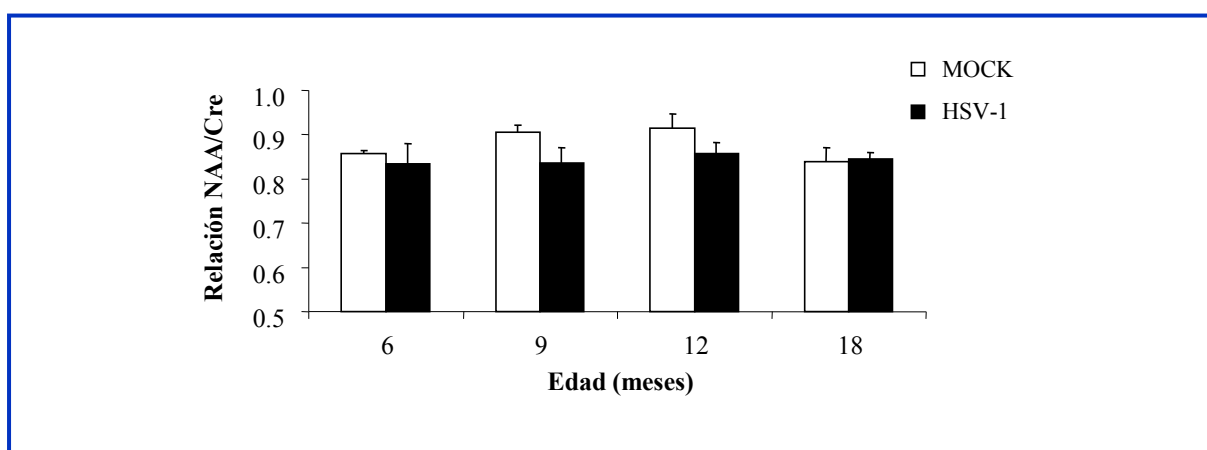


Figura R.53. Relación de NAA/Creatina en función de la edad y de la infección por HSV-1. Se inocularon ip a los 2 meses de edad hembras C57BL/6 salvajes con 1×10^6 ufp de HSV-1 KOS. A los 6, 9, 12 y 18 meses de edad se determinó por espectroscopía de vóxel único la relación de los principales metabolitos presentes en el encéfalo de 11 hembras infectadas y de 9 hembras mock (al menos 5 ratones por punto temporal).

A la vista de los resultados obtenidos mediante el análisis por resonancia magnética se puede concluir que el HSV-1 no produce alteraciones macroscópicas significativas en el encéfalo de los animales infectados. Sin embargo, los resultados espectroscópicos indican que el HSV-1 puede estar acelerando la pérdida neuronal normal que se produce durante el envejecimiento.

5.3.6. Estudio del deterioro cognitivo asociado a la infección por HSV-1.

Con el objetivo de determinar si las alteraciones patológicas descritas previamente conllevan la pérdida de memoria en los ratones infectados, se realizó un estudio de deterioro cognitivo mediante el test de reconocimiento de objetos en diferentes etapas de la vida de los ratones. Este test se basa en la tendencia natural que tienen los roedores a explorar durante más veces y/o más tiempo un objeto nuevo (novedoso) que un objeto conocido (Berline, 1950). El test consiste en la introducción del ratón bajo estudio en una cubeta con dos objetos iguales durante un periodo de tiempo concreto para que se familiarice con los objetos (habitución). A continuación, después de un periodo de tiempo determinado (en este estudio 48 horas), se vuelve a introducir al ratón en la cubeta que en esta ocasión contiene uno de los objetos utilizados en el primer día (objeto conocido) pero el otro se ha sustituido por un objeto diferente (nuevo), y se contabiliza el número de veces que el ratón explora cada uno de los objetos (reconocimiento de la novedad). Finalmente, se determina el número de veces que el ratón explora el objeto nuevo o desconocido frente al número de veces que explora el objeto conocido. Un valor próximo a 1 significa que los ratones no muestran preferencias por ningún objeto, lo que indica que esa tendencia natural a explorar el objeto nuevo está alterada, debido a daños cognitivos. Cuando este valor es mayor que 1 indica que los ratones presentan una tendencia mayor a explorar el objeto nuevo frente al conocido y que su memoria está intacta.

Para la realización del test se utilizaron ratones infectados, independientemente de la dosis viral de inoculación (1×10^6 ufp o 1×10^7 ufp), puesto que tanto en estudios previos de Burgos y col. (Burgos y cols., 2007) en hembras infectadas latentemente de 3 meses de edad, como en el apartado R.5.3.2.4. en ratones de 18 meses de edad, se muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en la carga viral presente en el encéfalo de dichos ratones. Además, los estudios de inflamación, de daño oxidativo y de astrogliosis tampoco muestran diferencias significativas en el daño mostrado entre los ratones inoculados con ambas dosis virales. La figura R.54. representa la media de la ratio del número de veces que los ratones exploran el objeto nuevo frente al conocido.

A los 3 meses de edad los ratones mock presentaron una tendencia un 27% mayor que los ratones infectados a explorar el objeto nuevo. Estos últimos, además, mostraron un valor de ratio próximo a 1 (ratio 1.09) que indica que los ratones tienen afectada la capacidad de reconocer el objeto nuevo. En los ratones de 6 meses la ratio se incrementa para ambos grupos de ratones, indicando una leve recuperación de la capacidad de reconocimiento para los ratones infectados, si bien los animales mock siguen reconociendo un 23% más el objeto novedoso que los ratones infectados (ratio de la exploración ratones mock 1.84 frente a 1.41 de los ratones infectados). Sin embargo, a los 9 y 12 meses de edad tanto los ratones mock como los ratones infectados, ven alterada su capacidad para reconocer el objeto nuevo y las ratios de ambos grupos se aproximan a 1 (ratio exploración animales mock de 9 meses 1.27 frente a 1.24 de los ratones infectados; y ratio de exploración de los animales mock de 12 meses 1.08 frente a 1.09 de los ratones infectados), lo que sugiere que en ambos casos el daño neurológico debido al envejecimiento puede estar causando el deterioro cognitivo mostrado. El estudio no se pudo realizar a los 18 meses de edad porque la mayoría de los ratones (infectados y mock) murieron antes de llegar a esa edad.

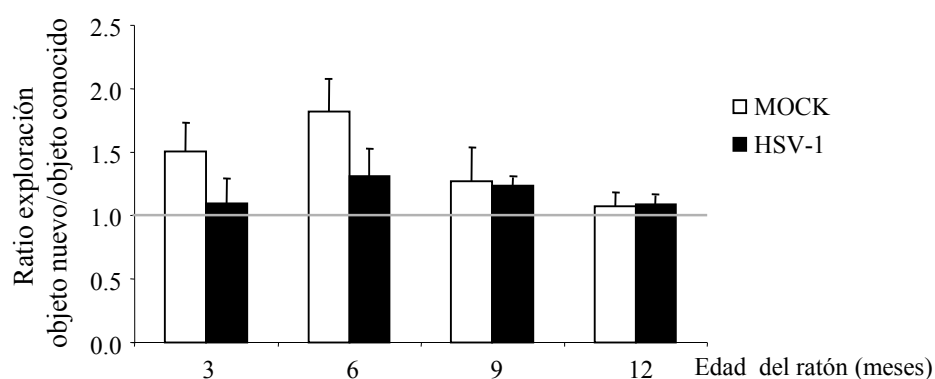


Figura R.54. Ratio del número de veces que los animales reconocen el objeto nuevo frente al conocido. Se inocularon ip con 1×10^6 ó 1×10^7 ufp de HSV-1 KOS ratones hembra C57BL/6 a los 2 meses de edad. Se realizaron test de reconocimiento de objetos a 29 ratones infectados y a 27 ratones mock a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad.

Los datos mostrados indican que la neuroinfección produce daños cognitivos en los animales infectados con el HSV-1.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

6.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La enfermedad de Alzheimer es un tipo de demencia de desarrollo progresivo que se caracteriza por la pérdida de la memoria y de otras habilidades mentales utilizadas en la vida diaria, y que es consecuencia de la muerte de las neuronas en las áreas responsables de la función cognitiva (Nussbaum and Ellis, 2003). Más de 35 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad (Querfurth and LaFerla, 2010) y, a pesar de que mutaciones en el *APP*, en la *PSEN 1* y en la *PSEN 2* son las responsables de la forma familiar de la EA de origen genético y de herencia autosómica dominante (Campion y cols., 1999), la inmensa mayoría de los casos (más del 99%) corresponden a la EA esporádica, presentando un origen desconocido y multifactorial, en el que tanto factores genéticos de susceptibilidad como factores ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Blennow y cols., 2006).

6.2. FACTORES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

El principal factor implicado en el desarrollo de la EA (independientemente de su variante) es el envejecimiento, dado que la prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad (Blennow y cols., 2006; Nussbaum and Ellis, 2003; Yankner y cols., 2008), afectando al 1% de la población de 65 años, al 33% de personas mayores de 85 años y llega a alcanzar entre el 40 y el 50% de los mayores de 95 años. Por ello, las alteraciones características del envejecimiento, como el daño oxidativo (Floyd and Hensley, 2002) o la inmunosenescencia (que se define como el declive del sistema inmune) (Linton and Thoman, 2001), podrían ser factores implicados en el desarrollo de la EA (Munoz and Feldman, 2000).

El género femenino es otro factor de riesgo asociado a la EA, debido a que se ha observado una mayor incidencia de casos de alzhéimer en mujeres de edad avanzada que en hombres (Farrer y cols., 1997; Jorm and Jolley, 1998; Turner, 2001), y que el género femenino adelanta la edad de aparición de la enfermedad en 1 ó 2 años (Daw y cols., 2000). Por otra parte, se ha descrito que la disminución de los niveles de estrógenos afecta negativamente a la función cognitiva (Paganini-Hill and Henderson, 1994; Turner, 2001), lo que explicaría la mayor incidencia de la enfermedad en mujeres de edad avanzada (Lerner, 1999), y que la suplementación de hormonas sexuales durante la menopausia ejerce un efecto neuroprotector (Paganini-Hill and Henderson, 1994; Tang y cols., 1996).

Por su parte, el *APOE ε4* es el factor de riesgo genético más fuertemente asociado con la EA (Bertram y cols., 2007; Coon y cols., 2007; Corder y cols., 1993), si bien este gen no es

necesario ni suficiente para el desarrollo de la patología (Farrer y cols., 1997). Además, trabajos de nuestro laboratorio así como de otros grupos, han revelado que los niveles de ApoE son también un factor de riesgo, ya que polimorfismos que conllevan un aumento en la actividad del promotor están asociados con una mayor predisposición a padecer la EA (Artiga y cols., 1998; Bullido y cols., 1998; Laws y cols., 2002).

6.3. HIPÓTESIS PATOGENICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: IMPLICACIÓN DEL VIRUS *HERPES SIMPLEX* DE TIPO 1.

En los últimos años la investigación de la EA se ha basado fundamentalmente en la “teoría amiloide” que propone como evento central de la enfermedad al procesamiento anormal del APP (Selkoe, 1991). Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no han generado los avances esperados en la comprensión de la patogénesis de esta enfermedad. Como consecuencia de este hecho se ha comenzado una revisión de las teorías existentes y se han abierto nuevas líneas de investigación en el estudio de las causas de la EA (Mandavilli, 2006).

A pesar de que la posible implicación de un agente infeccioso en la etiología de la EA está lejos de ser establecida, recientemente, varios virus como el HSV-1, el HSV-2, el HHV-6 y el CMV (Lin y cols., 2002), y bacterias como *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y diferentes espiroquetas (Balin y cols., 1998; Kountouras y cols., 2006) se han relacionado con la EA (Dobson y cols., 2003; Honjo y cols., 2009). De entre todos ellos, el HSV-1 es el más firme candidato a participar en el desarrollo de la enfermedad (Itzhaki and Wozniak, 2008). Las razones por las que se propone la asociación del HSV-1 con la EA son diversas y se basan en las características biológicas del virus, así como en estudios epidemiológicos y experimentales. El HSV-1 es un virus ubicuo en la población adulta, donde más del 90% de la población de edad avanzada posee anticuerpos contra el virus (Isacsohn y cols., 2002), lo que estaría en consonancia con la alta prevalencia de la EA (Blennow y cols., 2006). Además, el carácter neurotrópico del virus y la posibilidad de establecer latencia en las neuronas del encéfalo a lo largo de la vida del hospedador, y de reactivarse bajo diferentes estímulos (Roizman, 2007; Wozniak y cols., 2005), favorece la posible relación del HSV-1 con la enfermedad.

Por ello, en el presente trabajo se propuso el estudio de la posible implicación del HSV-1 en la EA mediante el análisis en un modelo experimental en ratones del efecto de los principales factores relacionados con el alzhéimer, como son el envejecimiento, el *apoE*, el género femenino y el daño oxidativo en la neuroinfección por HSV-1.

6.4. FACTORES COMÚNMENTE IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EN LA INFECCIÓN POR HSV-1.

6.4.1. El envejecimiento.

El envejecimiento es el principal factor de riesgo asociado a la EA, ya que la enfermedad se manifiesta en personas de edad avanzada, incluso en los casos de EA familiar donde la enfermedad debuta alrededor de los 50 años (Nussbaum and Ellis, 2003). Por tanto, si el HSV-1 estuviera asociado a la enfermedad, éste debería estar presente en el cerebro de un alto porcentaje de personas de edad avanzada. En este sentido, diferentes estudios han demostrado la presencia de DNA de HSV-1 tanto en cerebros de pacientes de EA como de controles de la misma edad (Beffert y cols., 1998; Itabashi y cols., 1997; Itzhaki y cols., 1997; Jamieson y cols., 1992). Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado experimentalmente en modelos animales el efecto del envejecimiento sobre los niveles de DNA de HSV-1 en el sistema nervioso. La única referencia previa, hasta nuestro conocimiento, demuestra que en las descendencias de animales infectados hematógicamente las cargas virales aumentan en el encéfalo de los ratones desde el nacimiento y hasta la edad adulta (Burgos y cols., 2006a), aunque este trabajo fue realizado en un modelo particular de infección como es la transmisión vertical. Por ello, el primer objetivo del presente estudio fue la puesta a punto de un modelo de infección asociado al envejecimiento, en el que se obtuvieran las mayores cargas virales posibles en el encéfalo, siendo éste un punto de partida para los posteriores estudios de imagen molecular, de estado cognitivo y de neuropatología. Basándonos en trabajos previos de nuestro laboratorio (Burgos y cols., 2002; Ramirez Moreno, 2006), se ha utilizado el modelo de infección hematógena en ratón, puesto que esta ruta de infección garantiza mayores niveles de virus en el encéfalo que la ruta neural (Serrano Saiz, 2007). Además, el análisis de la fase aguda de la infección hematógena por HSV-1 en diferentes cepas de ratones salvajes (C57BL/6, BALB/C y CD-1) mostró a la cepa C57BL/6 como la más adecuada para la realización de los estudios de infección y envejecimiento, ya que los animales C57BL/6 (al igual que los BALB/C) presentaron los niveles más altos de virus en el sistema nervioso. Sin embargo, al igual que sucedía en trabajos previos de otros autores (Kastrukoff y cols., 1986; Lopez, 1975), los ratones BALB/C mostraron una mortalidad elevada por lo que la ausencia de mortalidad presentada por la cepa C57BL/6 unida a los elevados niveles de virus en el encéfalo, la convierten en la cepa idónea para el estudio de la neuroinfección por el HSV-1.

En relación al envejecimiento, se analizó la modulación de las cargas virales en el encéfalo y en el ganglio trigémino de los ratones a diferentes tiempos post-infección (correspondientes a diferentes momentos de la vida de los ratones), por ser las regiones del sistema nervioso en

las que el HSV-1 establece latencia de forma preferencial en humanos (Baringer and Pisani, 1994; Baringer and Swoveland, 1973). En ambas regiones, se observa que las cargas virales se modulan con el tiempo, disminuyendo tras la primoinfección hasta presentar un mínimo a los 6 meses de edad debido, probablemente, a la acción directa del sistema inmune. Está ampliamente descrito que tras la infección por el virus HSV-1 la respuesta inmune innata detiene la infección en los primeros momentos (Mossman, 2002) y que la respuesta inmune adaptativa controla la infección durante la fase de latencia (Decman y cols., 2005; Khanna y cols., 2004). Como consecuencia del envejecimiento, los ratones de 12 meses presentaron un incremento en las cargas virales presentes en ambas regiones que se agudiza a los 18 meses de edad. Este incremento de las cargas virales con la edad podría explicarse por el declive del sistema inmune que tiene lugar con el envejecimiento (De la Fuente and Miquel, 2009; Linton and Thoman, 2001), lo que favorecería la aparición de procesos de reactivación viral (Dorshkind and Swain, 2009; Gomez y cols., 2008) y, por lo tanto, el aumento de los niveles de HSV-1 en el sistema nervioso. En definitiva, en este trabajo se demuestra en un modelo murino de infección hematogena que el envejecimiento está asociado a un aumento de las cargas del HSV-1 en el sistema nervioso y que dichas cargas virales se modulan a lo largo de la vida. Este resultado está en consonancia con los datos epidemiológicos en humanos en los que no se detecta DNA de HSV-1 en el cerebro de personas jóvenes ni de mediana edad pero sí en personas de edad avanzada (Jamieson y cols., 1992).

6.4.2. El daño oxidativo.

Es conocido que el envejecimiento se encuentra estrechamente asociado al aumento del estrés oxidativo en el organismo (Floyd and Hensley, 2002). En el contexto de la EA se han observado huellas de daño oxidativo en los cerebros de enfermos de alzhéimer, incluso en etapas tempranas de la enfermedad, lo que sugiere que el daño oxidativo es uno de los eventos primarios en la patogénesis de la EA (Nunomura y cols., 2001; Pratico y cols., 1998; Zhu y cols., 2005). Con el fin de analizar la posible influencia del daño oxidativo en la infección por HSV-1, se utilizó un modelo experimental consistente en el uso de un ratón transgénico que presenta un déficit parcial en el gen *sod2*, por lo que su capacidad para eliminar los radicales libres generadores de daño oxidativo se encuentra reducida, lo que le confiere mayor daño oxidativo que los ratones salvajes (Kokoszka y cols., 2001) y, probablemente, un envejecimiento acelerado. Al analizar la infección por el HSV-1 en los ratones *sod2* +/-, se observó que durante la fase aguda el daño oxidativo disminuía la eficiencia de la infección y, en particular, la neuroinvasión. Este hecho concuerda con trabajos previos de nuestro laboratorio en cultivos de neuroblastoma humano sometidos a estrés oxidativo, en los que también se observa una disminución en la eficiencia de

la infección en comparación con las células sin tratar (Santana Martínez, 2010). Sin embargo, en los ratones transgénicos infectados en su juventud y envejecidos hasta 18 meses se observa el efecto contrario, ya que los niveles de HSV-1 en el encéfalo aumentan con respecto a los ratones salvajes, probablemente debido a que el daño oxidativo acumulado durante la vida de los ratones contribuye al deterioro normal del sistema inmune con el envejecimiento (Linton and Thoman, 2001), lo que puede favorecer los procesos de reactivación viral y por lo tanto el aumento de la carga viral en el encéfalo.

En resumen, el estrés oxidativo parece modular la infección del HSV-1, disminuyendo las cargas virales en etapas tempranas tras la primoinfección y favoreciendo la neuroinvasión asociada al envejecimiento.

6.4.3. El sistema inmune.

En los últimos años se ha descrito en diferentes estudios que genes implicados en la respuesta a infecciones están a su vez asociados al riesgo de padecer Alzheimer. Entre ellos destacan el gen que codifica para el receptor 1 del componente C3b del complemento (Lambert y cols., 2009), el gen que codifica para PKR (Bullido y cols., 2008) o el gen que codifica para TAP2 (Bullido y cols., 2007). Polimorfismos en estos genes podrían estar contribuyendo a un funcionamiento deficiente del sistema inmune que contribuiría al desarrollo de infecciones, lo que refuerza la hipótesis infecciosa de la EA. Además, se ha descrito que los individuos inmunosuprimidos y los neonatos (donde el sistema inmune aún no está completamente desarrollado) son más susceptibles a las infecciones y a las reactivaciones virales que los individuos inmunocompetentes (Pereira y cols., 2003; Vollstedt y cols., 2003).

Debido a estos antecedentes, en el presente trabajo se analizó la interacción del sistema inmune con la infección por HSV-1, mediante el análisis de la infección en diferentes cepas de ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidas, ya que una de las variables principalmente implicadas en la infección por el HSV-1 es el estado inmunológico del hospedador (Vollstedt y cols., 2003). Así, se estudió la influencia de diferentes cepas de ratones (C57BL/6, CD-1, BALB/C, CD-1 *nude* y BALB/C *nude*) en la infección por el HSV-1, observándose que la mortalidad asociada a la infección por el HSV-1 KOS depende del estado inmunológico de los ratones. En este sentido, las cepas inmunodeprimidas o *nude* (carentes de linfocitos T) mostraron una mortalidad del 100%, mientras que las cepas inmunocompetentes presentaron valores de mortalidad intermedios. Este comportamiento de las cepas inmunodeprimidas coincide con resultados previos de otros grupos con el HSV-1 (Brandt, 1992) y con otros virus como el *Hantaanvirus* (Nakamura y cols., 1985).

Del mismo modo, la neuroinfección se ve afectada por el estado inmunológico de los ratones. Los ratones CD-1 *nude* presentaron los niveles más altos de virus en los tejidos del sistema nervioso (médula espinal, ganglio trigémino y encéfalo) seguidos por los ratones BALB/C inmunocompetentes e inmunodeprimidos y por los C57BL/6. Por su parte los ratones CD-1 inmunocompetentes presentaron las menores cargas virales en el sistema nervioso. De este modo, se pone de manifiesto que las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre las diferentes cepas están asociadas fundamentalmente al estatus de la respuesta inmune (Kastrukoff y cols., 1986; Lopez, 1975; Simmons, 1989)

Estos resultados experimentales destacan la relación del sistema inmune con la infección por HSV-1.

6.4.4. El *APOE* $\epsilon 4$.

El *APOE* $\epsilon 4$ es el principal factor genético asociado a la EA, y donde el riesgo de padecer la enfermedad aumenta para las personas que además de poseer este gen presentan DNA de HSV-1 en el cerebro (Itabashi y cols., 1997; Itzhaki y cols., 1997). No obstante, ni el *APOE* $\epsilon 4$ ni el HSV-1 por sí mismos son necesarios ni suficientes para padecer Alzheimer, aunque la asociación de ambos incrementa notablemente el riesgo de sufrir la enfermedad (Itzhaki, 2004). Sin embargo, a pesar de que los trabajos epidemiológicos anteriores establecen una estrecha relación entre el *APOE* $\epsilon 4$ y la infección por HSV-1 en el contexto de la EA, no explican de qué manera el *APOE* $\epsilon 4$ influye en la infección del cerebro o predispone a aquellas personas infectadas a desarrollar la EA. En este sentido, trabajos de nuestro laboratorio en el modelo murino de infección hematogena han demostrado experimentalmente la relación existente entre el *apoE* murino y la presencia de HSV-1 en el encéfalo. El *apoE* y el *APOE* $\epsilon 4$ aumentan los niveles de virus en el encéfalo de los ratones durante las fases aguda y latente de la infección, así como durante la transmisión vertical del virus de la madre a la descendencia (Burgos y cols., 2005) (Burgos y cols., 2002; Burgos y cols., 2003; Burgos y cols., 2006b; Burgos y cols., 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha analizado el efecto del *apoE* junto con la infección del HSV-1 durante el envejecimiento. Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido demostrar que la presencia de *apoE* influye en la infección del HSV-1 durante el envejecimiento, lo que favorece la mayor acumulación de genomas virales en el sistema nervioso de los ratones salvajes (*apoE* $+/+$) de 18 meses, en comparación con los ratones *apoE* $-/-$. Estos resultados obtenidos en el modelo experimental podrían extrapolarse a humanos portadores de *APOE* $\epsilon 4$, ya que el gen murino *apoE* presenta una homología de secuencia del 78% con el humano, y donde el *apoE* murino al igual que el ApoE4 humano presenta dos argininas en las posiciones clave (112

y 158) de la secuencia de aminoácidos de la proteína, a diferencia del ApoE3 que presenta una cisteína y una arginina en dichas posiciones (Rajavashisth y cols., 1985; Weisgraber, 1994). En definitiva, los datos experimentales sugieren que el *APOE* $\epsilon 4$ podría incrementar el riesgo de sufrir la EA mediante el aumento de las cargas de HSV-1 en el cerebro de las personas de edad avanzada.

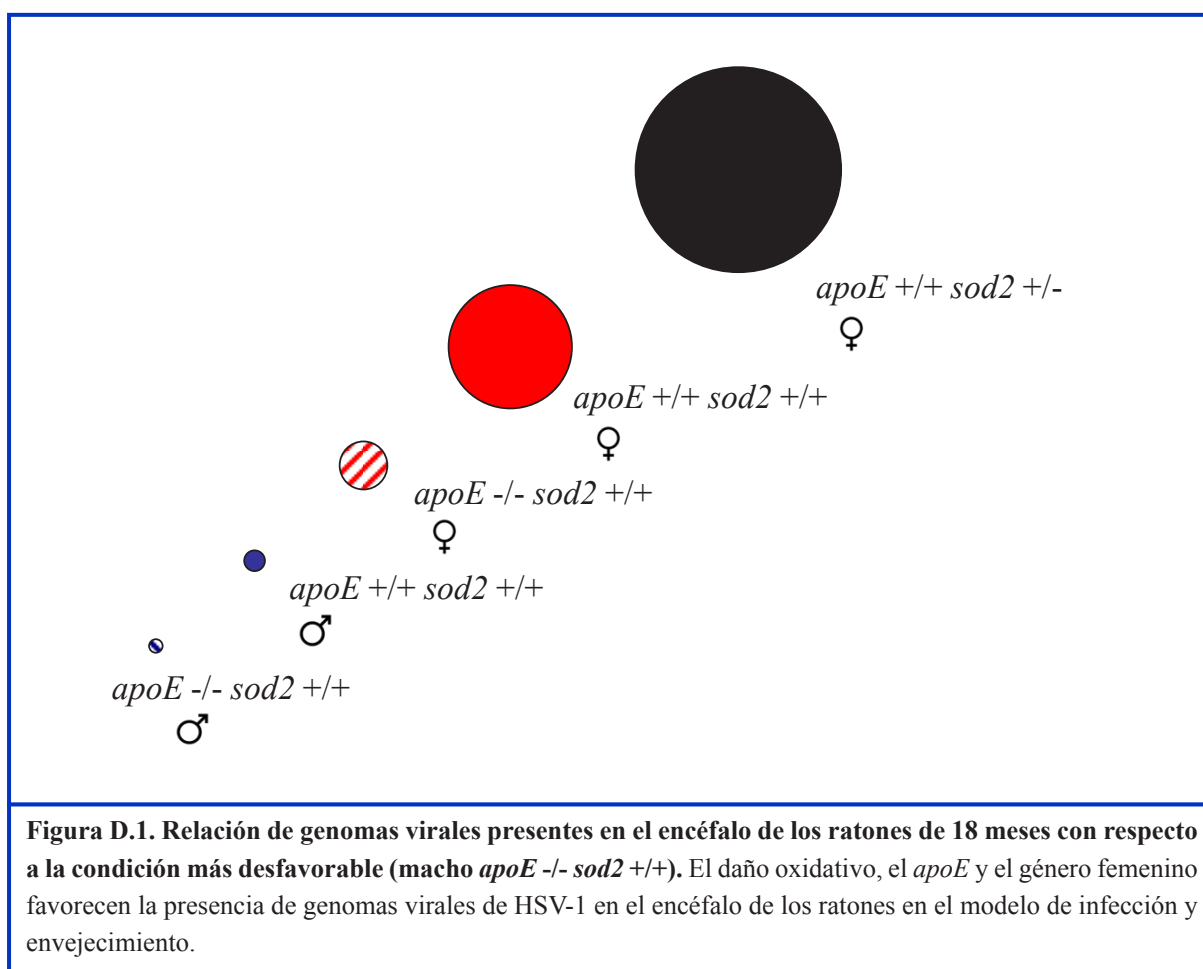
6.4.5. El género.

Otro de los factores que está implicado en la infección por el HSV-1 y que a su vez confiere riesgo para desarrollar la EA es el género femenino (Burgos y cols., 2005; Farrer y cols., 1997; Turner, 2001). Está ampliamente descrito que determinadas hormonas femeninas como los estrógenos favorecen la replicación del HSV-1, mientras que las hormonas masculinas como la testosterona la inhiben (Podlech y cols., 1990). En modelos animales se ha demostrado que la castración disminuye la resistencia de los machos a la infección, fenómeno que se ve revertido cuando los machos castrados son tratados con hormonas masculinas (Yirrell y cols., 1987). Además, estudios previos han demostrado que el acceso del HSV-1 a las gónadas y al SNC tras la infección hematógena está favorecido en las hembras con respecto a los machos (Burgos y cols., 2005). Así pues, uno de los objetivos de este estudio fue el análisis del efecto del género en la infección por HSV-1 en el modelo de envejecimiento en ratones. Los resultados obtenidos indican que las hembras de 18 meses presentan mayores niveles de DNA de HSV-1 en el encéfalo que los machos, confirmando resultados previos de infección aguda, latente y de transmisión vertical (Burgos y cols., 2006a; Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2007). Además, los resultados obtenidos en ratones *apoE* $+/+$ y en ratones deficientes *apoE* $-/-$ en los que las hembras presentan mayores niveles de virus en el sistema nervioso que los machos, sugieren que el género femenino y la presencia de *apoE* influyen conjuntamente en la infección por HSV-1 en los ratones envejecidos, aumentando los niveles virales presentes en el encéfalo, lo que convierte al género femenino y al *apoE* en factores de riesgo para el desarrollo de posibles patologías cerebrales asociadas a la infección por HSV-1, lo que concuerda con la EA.

6.4.6. El número de genomas virales en el sistema nervioso: ¿un hecho relevante en la enfermedad de Alzheimer?.

Se ha descrito que la combinación del *APOE* $\epsilon 4$ con la infección del HSV-1 en el cerebro aumenta hasta 12 veces el riesgo de sufrir la EA con respecto a la posesión de cada uno de estos factores por separado (Itzhaki, 2004). En este sentido, los resultados mostrados en este trabajo indican que el *apoE* favorece el acceso del virus al encéfalo de los ratones, sugiriendo que el

aumento del riesgo en los individuos infectados con HSV-1 en el cerebro y portadores de *APOE* $\epsilon 4$ podría deberse a los elevados niveles de virus en el encéfalo. De hecho, se ha propuesto que los daños neurológicos característicos de la EA podrían ser consecuencia de procesos de reactivación del HSV-1 a lo largo de la vida del individuo (Hill y cols., 2005; Itzhaki y cols., 1997) y que éstos son más probables cuanto mayor es el número de genomas en estado de latencia (Sawtell y cols., 1998). Los resultados obtenidos aquí muestran que los principales factores de riesgo para la EA coinciden con los relacionados con la neuroinfección por HSV-1 en ratones. El envejecimiento, y el daño oxidativo asociado, el *apoE* y el género femenino influyen en la infección de forma conjunta aumentando las cargas virales en el encéfalo de los ratones, como se observa en el esquema representativo de la figura D.1.



6.5. EFECTO NEUROPATOLÓGICO DEL HSV-1.

6.5.1. La neuroinvasión del HSV-1 en el modelo de infección hematógena.

La primoinfección por HSV-1 en humanos sigue normalmente una ruta neural, aunque la ruta hematógena de infección resulta de especial relevancia en individuos inmunosuprimidos y en neonatos (Arvin y cols., 1982; Montgomerie y cols., 1969; Roizman, 2007; Whitley and Roizman, 2001). En el presente trabajo se ha demostrado que la infección hematógena se caracteriza, en primer lugar, por la invasión sanguínea del virus que continua con la colonización de los ovarios y de las glándulas adrenales, y que finaliza con la infección de los tejidos nerviosos (encéfalo, ganglio trigémino y médula espinal), siendo éstos los que presentan las mayores cargas virales. Estos resultados corroboran trabajos previos de nuestro laboratorio (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002) y confirman el carácter neurotrópico del virus. El posterior análisis IHQ del encéfalo de los ratones durante la fase aguda reveló que las partículas virales se localizan mayoritariamente en la región *mesencefálica* (que aglutina médula oblonga, puente y mesencéfalo) indicando, como se había sugerido anteriormente (Ramirez Moreno, 2006), un acceso del virus al encéfalo a través de la médula espinal. Las regiones *diencefálicas* del tálamo y del hipotálamo se encuentran invadidas por el HSV-1 en un número de casos ligeramente inferior al de las áreas *mesencefálicas*. Por su parte, el cerebelo y la corteza se encuentran infectados por el HSV-1 en un menor número de ratones. Esta distribución del virus observada mediante el análisis inmunohistoquímico confirma los datos obtenidos por PCR cuantitativa y por trabajos previos de nuestro laboratorio (Burgos y cols., 2005; Burgos y cols., 2002) y sugiere una ruta expansiva del virus desde la médula espinal, colonizando las regiones *mesencefálica* y *diencefálica* hasta alcanzar las regiones más distales de la corteza y el cerebelo. Esta dispersión retrógrada del HSV-1, y la infección de la corteza, coinciden con la progresión de los procesos patológicos observados en el cerebro de los enfermos de alzhéimer (Hill y cols., 2005).

Durante la infección latente, se detectó la presencia de una cantidad mínima de proteínas virales en el mesencéfalo y en el hipotálamo de sólo 3 de 5 animales salvajes y en ninguno de los 5 animales *sod2* +/-, lo que está en consonancia con la supresión de la síntesis de proteínas virales descrita durante la latencia (Roizman and Sears, 1987). La presencia de proteínas virales en esta fase, aunque mínima, puede ser consecuencia de un proceso de reactivación viral espontáneo que se encontraría favorecido en las regiones que presentan mayor número de genomas virales en estado de latencia (Sawtell y cols., 1998) o ser consecuencia de restos de proteínas de la fase aguda de la infección que aún no han sido eliminadas. Sin embargo, en los ratones de 18 meses no se detectó la presencia de proteínas virales en ninguno de los 13 animales analizados (8 salvajes y 5 *sod2* +/-), lo que coincide con los resultados epidemiológicos en humanos.

Aunque la presencia de DNA de HSV-1 es prevalente en el cerebro de las personas de edad avanzada, no se detectan viriones ni proteínas virales en dichos cerebros, a excepción de un trabajo en el que se detectaron proteínas virales en 2 de 40 cerebros analizados (un cerebro con la enfermedad y un cerebro control) (Mann y cols., 1983), y otro más reciente donde se detectaron antígenos virales en las placas amiloides (Mori y cols., 2004). Por otra parte, en los cerebros de pacientes de encefalitis herpética no se detectan partículas virales una vez que la fase aguda de la infección ha finalizado, a pesar de la gran cantidad de virus que hay durante la fase aguda y de que se detecte DNA de virus en estos pacientes años después de la enfermedad (Lellouch-Tubiana y cols., 2000; Robinson y cols., 2004).

6.5.2. Efectos neuropatológicos de la infección.

Una de las principales características de los cerebros de los enfermos de alzhéimer son los marcadores de inflamación (Akiyama y cols., 2000; McGeer and McGeer, 2001), lo que podría ser compatible con los procesos de reactivación del HSV-1 (Hill y cols., 2005; Itzhaki, 2004; Robinson y cols., 2004). El análisis histológico realizado en cortes contiguos del encéfalo de los ratones demostró que, durante la fase aguda, la neuroinfección por el HSV-1 induce, como ya se había demostrado previamente (Anderson and Field, 1983; Esiri y cols., 1995), la aparición de infiltrados mononucleares (neuroinflamación) en las regiones encefálicas en las que se detectan antígenos virales. Sin embargo, en algunas ocasiones la presencia de proteínas virales no está acompañada de marcas de neuroinflamación, lo que puede ser consecuencia del retraso que se produce entre el proceso de infección y el reclutamiento de los marcadores inflamatorios (Anderson and Field, 1983). Del mismo modo, la detección de infiltrados mononucleares durante la latencia se restringe a las áreas en las que se detectan antígenos virales, lo que podría indicar que la aparición de la neuroinflamación es consecuencia de infecciones productivas y de procesos de reactivación del virus.

Además, los resultados obtenidos muestran que la neuroinfección también induce la aparición de astrogliosis y de daño oxidativo en el encéfalo de los ratones, tanto durante la fase aguda como durante la fase de latencia, lo que coincide con trabajos previos (Marques y cols., 2008; Valyi-Nagy and Dermody, 2005; Valyi-Nagy y cols., 2000). Este hecho sugiere, nuevamente, que el HSV-1 podría estar generando el daño oxidativo observado en los cerebros de enfermos de alzhéimer (Markesbery and Lovell, 1998; Nunomura y cols., 2001), aunque no existen referencias previas donde se haya analizado este efecto en un modelo de envejecimiento. En los ratones salvajes de 18 meses no se observaron diferencias en la neuroinflamación, ni en la astrogliosis, ni en el daño oxidativo entre los ratones infectados y los controles. Sin embargo,

en el modelo de daño oxidativo en los ratones de 18 meses se observó un ligero incremento en el daño oxidativo por efecto de la infección, lo que sugiere que el estrés acumulado en estos ratones durante toda la vida podría estar favoreciendo los efectos deletéreos del virus. Este hecho confirma los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en modelos celulares, en los que se observa un incremento de los efectos de la infección por HSV-1 en la acumulación del péptido A β intracelular y en la disminución de la secreción del A β debido al tratamiento de las células infectadas con un sistema generador de estrés oxidativo (Santana Martínez, 2010).

6.5.3. Estudios in vivo de infección y de neurodegeneración.

Otra forma de estudiar el efecto neuropatológico del HSV-1 es mediante técnicas no invasivas, las cuales permiten el análisis de la infección y de sus consecuencias. Por este motivo, se empleó la técnica de la bioluminiscencia para estudiar la infección del HSV-1. Los resultados obtenidos muestran que el virus bioluminiscente utilizado para este estudio, el HSV-1 KOS/Dlux/oriL, presenta un escaso tropismo neuronal, independientemente de la dosis viral de inoculación empleada (de 10^5 a 10^7 ufp), del tiempo post-infección analizado (de 0.8 a 37 dpi) y del estado inmunológico de la cepa de ratón utilizada (cepas inmunocompetentes e inmunodeprimidas), coincidiendo con resultados previos (Luker y cols., 2002; Summers and Leib, 2002). El escaso tropismo neuronal impide el uso de este virus para la realización de estudios de neuroinfección aunque es una herramienta válida para el estudio de infecciones sistémicas.

Por otra parte, se ha empleado la resonancia magnética de imagen para el análisis de los cambios morfológicos asociados a la infección, ya que esta metodología está ampliamente extendida en la clínica para el estudio de las alteraciones neurológicas en humanos (Frisoni y cols., 2010), y especialmente en la EA donde los pacientes presentan alteraciones morfológicas en el hipocampo y en los ventrículos (Ibanez and Deiber, 2009; Ott y cols., 2010). Aquí, se realizaron estudios durante la infección latente en diferentes momentos de la vida de los ratones y se observó que ni la infección ni tampoco el envejecimiento inducían alteraciones morfológicas evidentes en los estudios de imagen utilizando las secuencias de resonancia potenciadas en T2, que aportan información detallada de la anatomía del encéfalo (Alvarez-Linera, 2010; Symms y cols., 2004). Del mismo modo, tampoco se observaron alteraciones en los estudios de contraste por transferencia de magnetización, que permiten evaluar el deterioro de las vainas de mielina que rodean a los axones (Zivadinov, 2007). Sin embargo, el análisis espectroscópico de los metabolitos presentes en el encéfalo indicó que la infección estaba asociada a un descenso en

la relación NAA/Cre. La disminución de esta ratio es un factor ampliamente aceptado como indicador de la muerte neuronal (Dedeoglu y cols., 2004; Rudkin and Arnold, 1999). Por lo tanto, la disminución observada se traduce en que la infección acelera la pérdida normal de neuronas producto del envejecimiento, apreciándose esta tendencia desde el primer momento del estudio cuando los ratones contaban con 6 meses de edad. Sin embargo, a los 18 meses de edad los niveles de NAA/Cre se igualaban en los ratones control y en los ratones infectados, lo que sugiere que a esta edad el daño neuronal en los ratones de ambos grupos está muy avanzado.

6.5.4. Fenotipado conductual.

La EA se caracteriza por el deterioro de las funciones cognitivas de los afectados (Blennow y cols., 2006). Además, recientemente se ha observado una pérdida transitoria de la función cognitiva en pacientes de EA que han sufrido una infección (Holmes y cols., 2003). Para modelizar el deterioro cognitivo en ratones, se empleó el test de reconocimiento de objetos, el cual ha sido ampliamente utilizado para la realización de estudios de memoria (Berline, 1950; Bevins and Besheer, 2006). Este test se basa en la tendencia natural que tienen los roedores de explorar durante más veces y/o más tiempo un objeto que aparece ante ellos por primera vez que un objeto conocido (Berline, 1950). Cuando los ratones no distinguen entre el objeto novedoso y el conocido se considera que sufren una alteración cognitiva. Los ratones fueron sometidos a este test a diferentes tiempos post-infección correspondientes a 3, 6, 9 y 12 meses de edad, con el fin de determinar si la infección por el HSV-1 y el envejecimiento inducen daños neuronales en los animales. Los datos experimentales mostraron que la infección en ratones conlleva un deterioro cognitivo que se observa desde el primer momento de análisis (a los 3 meses de edad) y que se ve confirmado en el resto de puntos temporales analizados (de 6 a 12 meses de edad). Sin embargo, los ratones control presentaron una función cognitiva normal tanto a los 3 como a los 6 meses de edad, apareciendo las alteraciones cognitivas a partir de los 9 meses, debido probablemente al envejecimiento. Estos resultados indican que la infección está asociada a la aparición de deterioro cognitivo desde los primeros momentos tras la infección, aportando nuevas evidencias en la asociación de la infección con la EA.

Resumen final

En resumen, los experimentos aquí mostrados aclaran ciertos aspectos relacionados con la posible implicación del HSV-1 en la EA. El envejecimiento, el *APOE ε4*, el género femenino y el daño oxidativo son los principales factores relacionados con la EA esporádica. Estos

misimos factores aumentan los niveles de HSV-1 en el encéfalo de los ratones en un modelo experimental de infección y envejecimiento. Además, el HSV-1 induce neuroinflamación, daño oxidativo y astrogliosis en el encéfalo de los ratones, alteraciones que conllevan una pérdida neuronal y un deterioro cognitivo y que son coincidentes con lo observado en la EA. Aunque la participación del HSV-1 en la EA se encuentra lejos de ser establecida, los resultados presentados en este trabajo suman evidencias que sugieren que dicho patógeno podría estar desempeñando un papel relevante en esta enfermedad. El conjunto de los resultados descritos, además, permite profundizar en la comprensión de los efectos deletéreos de la neuroinfección del HSV-1 y refuerzan el papel de dicho virus en procesos neurodegenerativos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones extraídas del presente trabajo son las siguientes:

1. La resistencia a la infección por HSV-1 se modula en función del estado del sistema inmune y de la cepa de ratón utilizada. La mortalidad presentada por las distintas cepas de ratones, así como las diferencias en las cargas virales detectadas, son debidas a diferencias en el estado del sistema inmune. La cepa CD-1 resultó ser considerablemente más resistente a la infección que las cepas C57BL/6 y BALB/C. Además, las cepas inmunodeprimidas CD-1 *nude* y BALB/C *nude* son más susceptibles a la infección que sus variantes inmunocompetentes.

2. Existe una modulación de los niveles de HSV-1 en el sistema nervioso a lo largo de la vida de los ratones. Las cargas virales presentes en el encéfalo y en el ganglio trigémino de los ratones disminuyen tras la infección aguda en las primeras etapas de la vida. A partir de mitad de la vida del ratón, y posiblemente por el deterioro del sistema inmune con el envejecimiento, las cargas virales aumentan en las regiones neurales, favoreciendo las patologías asociadas al HSV-1 y relacionadas con la edad. Además, en los ratones envejecidos el virus se encuentra preferencialmente en los tejidos del sistema nervioso, destacando el carácter neurotrópico del HSV-1 y su potencial efecto neuropatogénico.

3. Los principales factores de riesgo relacionados con la enfermedad de alzhéimer, influyen en las cargas virales presentes en el encéfalo de los ratones de edad avanzada. El envejecimiento, el *apoE* y el género femenino facilitan la neuroinfección del HSV-1 en los tejidos nerviosos de los animales de edad avanzada.

4. El daño oxidativo influye en la infección del HSV-1. El daño oxidativo generado por el déficit parcial del gen de la superóxido dismutasa 2 produce una disminución de las cargas virales presentes en el sistema nervioso de los ratones durante la infección aguda, pero favorece el aumento de dichas cargas en los ratones envejecidos de 18 meses de edad.

5. El HSV-1 induce eventos asociados a la neurodegeneración en modelos murinos de infección. La presencia de partículas virales en el encéfalo de los ratones induce neuroinflamación, daño oxidativo y astrogliosis de forma dependiente de la carga viral durante las fases aguda y latente de la infección. En los ratones infectados de 18 meses, aunque no se detectan partículas virales, sí se observan alteraciones relacionadas con la neurodegeneración en el modelo murino de daño oxidativo, resaltando el efecto sumatorio del envejecimiento y del daño oxidativo con la infección. Además, el HSV-1 genera daño cognitivo desde su entrada en latencia, el cual se agrava con el envejecimiento.

6. La bioluminiscencia y la resonancia magnética son técnicas de imagen válidas para el estudio longitudinal de la infección por HSV-1. La correlación entre las cargas virales detectadas por bioluminiscencia *in vivo*, luminiscencia *in vitro* y PCR cuantitativa en los ratones infectados con HSV-1 KOS/Dlux/oriL, validan a la bioluminiscencia como técnica adecuada para el seguimiento no invasivo de la infección hematógena por el HSV-1 en modelos murinos, y revelan que las limitaciones de esta técnica se pueden superar mediante el empleo combinado de técnicas clásicas de análisis. Por su parte, la resonancia magnética y, en concreto, el análisis de los principales metabolitos presentes en el encéfalo mediante espectroscopía *in vivo*, permiten el estudio longitudinal del encéfalo de los ratones durante la infección, aunque, como en el caso anterior, el uso combinado de técnicas invasivas complementa los resultados obtenidos con esta técnica.

Conclusión final

En el presente trabajo se ha estudiado, por primera vez, el efecto del envejecimiento sobre la neuroinfección por HSV-1 en un modelo murino y sus consecuencias neuropatológicas. Los resultados obtenidos indican que los principales factores relacionados con la enfermedad de Alzheimer como son el envejecimiento y el daño oxidativo asociado, el *apoE* y el género femenino aumentan los niveles de virus en el encéfalo de los ratones de edad avanzada infectados en la juventud. El virus alojado en el encéfalo provoca una serie de eventos patológicos tales como la inducción de un proceso inflamatorio, el desarrollo de astrogliosis y la aparición de daño oxidativo, así como una pérdida de neuronas y la disminución de la capacidad cognitiva de los ratones. Los resultados mostrados en este trabajo ahondan en la comprensión de los efectos deletéreos de la neuroinfección del HSV-1 y refuerzan el papel de dicho virus en procesos neurodegenerativos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. and Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 383-421.

Al-khatib, K., Williams, B. R., Silverman, R. H., Halford, W. and Carr, D. J. (2003). The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. *Virology* **313**, 126-35.

Alvarez-Linera, J. Magnetic resonance techniques for the brainstem. *Semin Ultrasound CT MR* **31**, 230-45.

Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* **10 Suppl**, S18-25.

Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J. M., Stijnen, T. and Hofman, A. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* **53**, 1992-7.

Anderson, J. R. and Field, H. J. (1983). The distribution of herpes simplex type 1 antigen in mouse central nervous system after different routes of inoculation. *J Neurol Sci* **60**, 181-95.

Artiga, M. J., Bullido, M. J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., Lendon, C. L., Han, S. W., Morris, J. C., Vazquez, J., Goate, A. and Valdivieso, F. (1998). Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet* **7**, 1887-92.

Arvin, A. M., Yeager, A. S., Bruhn, F. W. and Grossman, M. (1982). Neonatal herpes simplex infection in the absence of mucocutaneous lesions. *J Pediatr* **100**, 715-21.

Balin, B. J., Gerard, H. C., Arking, E. J., Appelt, D. M., Branigan, P. J., Abrams, J. T., Whittum-Hudson, J. A. and Hudson, A. P. (1998). Identification and localization of

Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* **187**, 23-42.

Ball, M. J. (1982). "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?" *Can J Neurol Sci* **9**, 303-6.

Ball, M. J. (1986). Herpesvirus in the hippocampus as a cause of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* **43**, 313.

Baringer, J. R. (1974). Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions. *N Engl J Med* **291**, 828-30.

Baringer, J. R. and Pisani, P. (1994). Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann Neurol* **36**, 823-9.

Baringer, J. R. and Swoveland, P. (1973). Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med* **288**, 648-50.

Beffert, U., Bertrand, P., Champagne, D., Gauthier, S. and Poirier, J. (1998). HSV-1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **351**, 1330-1.

Berger, F., Paulmurugan, R., Bhaumik, S. and Gambhir, S. S. (2008). Uptake kinetics and biodistribution of ¹⁴C-D-luciferin--a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**, 2275-85.

Berline, D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *Br J Psychol* **41**, 68-80.

Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D. and Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* **39**, 17-23.

Bevins, R. A. and Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* **1**, 1306-11.

Beyer, C. F., Hill, J. M., Reidy, J. J. and Beuerman, R. W. (1990). Corneal nerve disruption reactivates virus in rabbits latently infected with HSV-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**, 925-32.

Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.

Brandt, C. R. (1992). Susceptibility of +/+, +/- and nu/nu BALB/c mice to ocular herpes simplex virus infection. *Ophthalmic Res* **24**, 332-7.

Budinger, T. F., Benaron, D. A. and Koretsky, A. P. (1999). Imaging transgenic animals. *Annu Rev Biomed Eng* **1**, 611-48.

Buijs, R. M., Wortel, J., Van Heerikhuize, J. J., Feenstra, M. G., Ter Horst, G. J., Romijn, H. J. and Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* **11**, 1535-44.

Bullido, M. J., Artiga, M. J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M. A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S. W., Morris, J. C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. and Valdivieso, F. (1998). A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* **18**, 69-71.

Bullido, M. J., Martinez-Garcia, A., Artiga, M. J., Aldudo, J., Sastre, I., Gil, P., Coria, F., Munoz, D. G., Hachinski, V., Frank, A. and Valdivieso, F. (2007). A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in APOE4 carriers. *Neurobiol Aging* **28**, 519-23.

Bullido, M. J., Martinez-Garcia, A., Tenorio, R., Sastre, I., Munoz, D. G., Frank, A. and Valdivieso, F. (2008). Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **29**, 1160-6.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Brachet, A., Alfaro, J. M., Sastre, I. and Valdivieso, F. (2007a). Changes in immunoglobulin levels related to herpes simplex virus type 1 brain infection in pregnant mice. *J Neurovirol* **13**, 233-41.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Guzman-Sanchez, F., Alfaro, J. M., Sastre, I. and Valdivieso, F. (2006a). Hematogenous vertical transmission of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Virol* **80**, 2823-31.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Alfaro, J. M. and Valdivieso, F. (2005). Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender. *J Virol* **79**, 1605-12.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J. and Valdivieso, F. (2002a). Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *J Virol* **76**, 12394-8.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J. and Valdivieso, F. (2003). ApoE4

is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport* **14**, 1825-7.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I. and Valdivieso, F. (2006b). Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simplex virus type 1 DNA. *J Virol* **80**, 5383-7.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I. and Valdivieso, F. (2007b). Apolipoprotein E genotype influences vertical transmission of herpes simplex virus type 1 in a gender specific manner. *Aging Cell* **6**, 841-2.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Tenorio, R., Sastre, I. and Bullido, M. J. (2002b). Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. *Mol Cell Probes* **16**, 257-60.

Burgos, J. S., Serrano-Saiz, E., Sastre, I. and Valdivieso, F. (2006c). ICP47 mediates viral neuroinvasiveness by induction of TAP protein following intravenous inoculation of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Neurovirol* **12**, 420-7.

Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A. and Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* **65**, 664-70.

Carrascosa, A. L., Santaren, J. F. and Vinuela, E. (1982). Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods* **3**, 303-10.

Coles, R. M., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R. and Brooks, A. G. (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* **168**, 834-8.

Contag, C. H., Spilman, S. D., Contag, P. R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D. K. and Benaron, D. A. (1997). Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol* **66**, 523-31.

Cook, M. L. and Stevens, J. G. (1976). Latent herpetic infections following experimental viraemia. *J Gen Virol* **31**, 75-80.

Coon, K. D., Myers, A. J., Craig, D. W., Webster, J. A., Pearson, J. V., Lince, D. H., Zismann, V. L., Beach, T. G., Leung, D., Bryden, L., Halperin, R. F., Marlowe, L., Kaleem, M., Walker, D. G., Ravid, R., Heward, C. B., Rogers, J., Papassotiropoulos, A., Reiman,

E. M., Hardy, J. and Stephan, D. A. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* **68**, 613-8.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-3.

Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-95.

Cribbs, D. H., Azizeh, B. Y., Cotman, C. W. and LaFerla, F. M. (2000). Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. *Biochemistry* **39**, 5988-94.

Chen, S. H., Yao, H. W., Huang, W. Y., Hsu, K. S., Lei, H. Y., Shiau, A. L. and Chen, S. H. (2006). Efficient reactivation of latent herpes simplex virus from mouse central nervous system tissues. *J Virol* **80**, 12387-92.

Davison, A. J. (2008). Herpesviruses: General Features. In *Encyclopedia of Virology*, vol. 2 (ed. B. W. J. Mahy), pp. 430-442: Elsevier.

Daw, E. W., Payami, H., Nemens, E. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Schellenberg, G. D. and Wijsman, E. M. (2000). The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* **66**, 196-204.

De la Fuente, M. and Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* **15**, 3003-26.

Decman, V., Freeman, M. L., Kinchington, P. R. and Hendricks, R. L. (2005). Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunol* **18**, 466-73.

Dedeoglu, A., Choi, J. K., Cormier, K., Kowall, N. W. and Jenkins, B. G. (2004). Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res* **1012**, 60-5.

Dobson, C. B., Wozniak, M. A. and Itzhaki, R. F. (2003). Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol* **11**, 312-7.

Dorshkind, K. and Swain, S. (2009). Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol* **21**, 404-7.

Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenberg, A., van Swieten, J. C., Stijnen, T., Hofman, A., Witteman, J. C. and Breteler, M. M. (2004). Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Arch Neurol* **61**, 668-72.

Esiri, M. M., Drummond, C. W. and Morris, C. S. (1995). Macrophages and microglia in HSV-1 infected mouse brain. *J Neuroimmunol* **62**, 201-5.

Farrell, M. J., Dobson, A. T. and Feldman, L. T. (1991). Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 790-4.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N. and van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* **278**, 1349-56.

Feldman, L. T., Ellison, A. R., Voytek, C. C., Yang, L., Krause, P. and Margolis, T. P. (2002). Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 978-83.

Floyd, R. A. and Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* **23**, 795-807.

Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E. and Tansey, M. G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener* **4**, 47.

Fratiglioni, L., De Ronchi, D. and Aguero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* **15**, 365-75.

Friedman, H. M., Wang, L., Fishman, N. O., Lambris, J. D., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. and Lubinski, J. (1996). Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J Virol* **70**, 4253-60.

Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Jr., Scheltens, P. and Thompson, P. M. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 67-77.

Garcia, M. A., Meurs, E. F. and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811.

Gelmini, S., Orlando, C., Sestini, R., Vona, G., Pinzani, P., Ruocco, L. and Pazzagli, M. (1997). Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin Chem* **43**, 752-8.

Gerendai, I. and Halasz, B. (2000). Central nervous system structures connected with the endocrine glands. findings obtained with the viral transneuronal tracing technique. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**, 389-95.

Gerendai, I., Kocsis, K. and Halasz, B. (2002). Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* **59**, 474-83.

Gesser, R. M., Valyi-Nagy, T., Altschuler, S. M. and Fraser, N. W. (1994). Oral-oesophageal inoculation of mice with herpes simplex virus type 1 causes latent infection of the vagal sensory ganglia (nodose ganglia). *J Gen Virol* **75** (Pt 9), 2379-86.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G. and Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**, 1495-500.

Gomez, C. R., Nomellini, V., Faunce, D. E. and Kovacs, E. J. (2008). Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* **43**, 718-28.

Halford, W. P., Balliet, J. W. and Gebhardt, B. M. (2004). Re-evaluating natural resistance to herpes simplex virus type 1. *J Virol* **78**, 10086-95.

Halford, W. P., Veress, L. A., Gebhardt, B. M. and Carr, D. J. (1997). Innate and acquired immunity to herpes simplex virus type 1. *Virology* **236**, 328-37.

Hardy, J. and Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383-8.

Hardy, J., Edinger, M., Bachmann, M. H., Negrin, R. S., Fathman, C. G. and Contag, C. H. (2001). Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hematol* **29**, 1353-60.

Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.

Harman, D. (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7124-8.

He, B., Gross, M. and Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex

virus 1 complexes with protein phosphatase 1 α to dephosphorylate the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 843-8.

Hill, J. M., Dudley, J. B., Shimomura, Y. and Kaufman, H. E. (1986a). Quantitation and kinetics of induced HSV-1 ocular shedding. *Curr Eye Res* **5**, 241-6.

Hill, J. M., Gebhardt, B. M., Azcuay, A. M., Matthews, K. E., Lukiw, W. J., Steiner, I., Thompson, H. W. and Ball, M. J. (2005). Can a herpes simplex virus type 1 neuroinvasive score be correlated to other risk factors in Alzheimer's disease? *Med Hypotheses* **64**, 320-7.

Hill, J. M., Rayfield, M. A. and Haruta, Y. (1987). Strain specificity of spontaneous and adrenergically induced HSV-1 ocular reactivation in latently infected rabbits. *Curr Eye Res* **6**, 91-7.

Hill, T. J., Field, H. J. and Blyth, W. A. (1975). Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. *J Gen Virol* **28**, 341-53.

Hill, T. J., Yirrell, D. L. and Blyth, W. A. (1986b). Infection of the adrenal gland as a route to the central nervous system after viraemia with herpes simplex virus in the mouse. *J Gen Virol* **67** (Pt 2), 309-20.

Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., Culliford, D. and Perry, V. H. (2009). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 768-74.

Holmes, C., El-Okl, M., Williams, A. L., Cunningham, C., Wilcockson, D. and Perry, V. H. (2003). Systemic infection, interleukin 1 β , and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**, 788-9.

Honess, R. W. and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**, 8-19.

Honjo, K., van Reekum, R. and Verhoeff, N. P. (2009). Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement* **5**, 348-60.

Ibanez, V. and Deiber, M. P. (2009). Functional imaging in mild cognitive impairment and

early Alzheimer's disease: is it pertinent? *Front Neurol Neurosci* **24**, 30-8.

Ignatius, M. J., Gebicke-Harter, P. J., Skene, J. H., Schilling, J. W., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. and Shooter, E. M. (1986). Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1125-9.

in t' Veld, B. A., Ruitenbergh, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., Breteler, M. M. and Stricker, B. H. (2001). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **345**, 1515-21.

Isacsohn, M., Smetana, Z., Rones, Z. Z., Raveh, D., Diamant, Y., Samueloff, A., Shaya, M., Mendelson, E., Slater, P., Rudenski, B., On, E. B. and Morag, A. (2002). A sero-epidemiological study of herpes virus type 1 and 2 infection in Israel. *J Clin Virol* **24**, 85-92.

Itabashi, S., Arai, H., Matsui, T., Higuchi, S. and Sasaki, H. (1997). Herpes simplex virus and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1102.

Itzhaki, R. (2004). Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Herpes* **11 Suppl 2**, 77A-82A.

Itzhaki, R. F., Lin, W. R., Shang, D., Wilcock, G. K., Faragher, B. and Jamieson, G. A. (1997). Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 241-4.

Itzhaki, R. F. and Wozniak, M. A. (2008). Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within. *J Alzheimers Dis* **13**, 393-405.

Jamieson, G. A., Maitland, N. J., Wilcock, G. K., Yates, C. M. and Itzhaki, R. F. (1992). Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J Pathol* **167**, 365-8.

Javier, R. T., Stevens, J. G., Dissette, V. B. and Wagner, E. K. (1988). A herpes simplex virus transcript abundant in latently infected neurons is dispensable for establishment of the latent state. *Virology* **166**, 254-7.

Jellinger, K. A. (2004). Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol* **17**, 719-23.

Johnson, R. T. (1964). The Pathogenesis of Herpes Virus Encephalitis. I. Virus Pathways to the Nervous System of Suckling Mice Demonstrated by Fluorescent Antibody Staining. *J Exp Med* **119**, 343-56.

Johnson, R. T. (1998). Herpesvirus Infections. In *Viral Infections of the Nervous System*, (ed. M. Placito), pp. 133-168. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Jones, C. M., Cose, S. C., Coles, R. M., Winterhalter, A. C., Brooks, A. G., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2000). Herpes simplex virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte arming occurs within lymph nodes draining the site of cutaneous infection. *J Virol* **74**, 2414-9.

Jorm, A. F. and Jolley, D. (1998). The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* **51**, 728-33.

Kalman, J., Juhasz, A., Laird, G., Dickens, P., Jandanhazy, T., Rimanoczy, A., Boncz, I., Parry-Jones, W. L. and Janka, Z. (1997). Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* **96**, 236-40.

Kamer, A. R., Craig, R. G., Dasanayake, A. P., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L. and de Leon, M. J. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement* **4**, 242-50.

Kammerman, E. M., Neumann, D. M., Ball, M. J., Lukiw, W. and Hill, J. M. (2006). Senile plaques in Alzheimer's diseased brains: possible association of beta-amyloid with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) L-particles. *Med Hypotheses* **66**, 294-9.

Kapahi, P., Boulton, M. E. and Kirkwood, T. B. (1999). Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic Biol Med* **26**, 495-500.

Kastrukoff, L. F., Lau, A. S. and Puterman, M. L. (1986). Genetics of natural resistance to herpes simplex virus type 1 latent infection of the peripheral nervous system in mice. *J Gen Virol* **67** (Pt 4), 613-21.

Katz, J. P., Bodin, E. T. and Coen, D. M. (1990). Quantitative polymerase chain reaction analysis of herpes simplex virus DNA in ganglia of mice infected with replication-incompetent mutants. *J Virol* **64**, 4288-95.

Kavouras, J. H., Prandovszky, E., Valyi-Nagy, K., Kovacs, S. K., Tiwari, V., Kovacs, M., Shukla, D. and Valyi-Nagy, T. (2007). Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol* **13**, 416-25.

Khanna, K. M., Lepisto, A. J., Decman, V. and Hendricks, R. L. (2004). Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol* **16**, 463-9.

Kokjohn, T. A. and Roher, A. E. (2009). Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimers Dement* **5**, 340-7.

Kokoszka, J. E., Coskun, P., Esposito, L. A. and Wallace, D. C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2278-83.

Kooy, R. F., Verhoye, M., Lemmon, V. and Van Der Linden, A. (2001). Brain studies of mouse models for neurogenetic disorders using in vivo magnetic resonance imaging (MRI). *Eur J Hum Genet* **9**, 153-9.

Koprowski, H., Zheng, Y. M., Heber-Katz, E., Fraser, N., Rorke, L., Fu, Z. F., Hanlon, C. and Dietzschold, B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3024-7.

Kountouras, J., Tsolaki, M., Gavalas, E., Boziki, M., Zavos, C., Karatzoglou, P., Chatzopoulos, D. and Venizelos, I. (2006). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology* **66**, 938-40.

Lacaille, V. G. and Androlewicz, M. J. (1998). Herpes simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen processing (TAP) heterodimer. *J Biol Chem* **273**, 17386-90.

Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fievet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., de Pancorbo, M. M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M. and Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*.

Lascano, E. F. and Berria, M. I. (1980). Histological study of the progression of herpes simplex virus in mice. *Arch Virol* **64**, 67-79.

Laws, S. M., Hone, E., Taddei, K., Harper, C., Dean, B., McClean, C., Masters, C., Lautenschlager, N., Gandy, S. E. and Martins, R. N. (2002). Variation at the APOE -491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Mol Psychiatry* **7**, 886-90.

Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S. and Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9782-7.

Leib, D. A., Bogard, C. L., Kosz-Vnenchak, M., Hicks, K. A., Coen, D. M., Knipe, D. M. and Schaffer, P. A. (1989). A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. *J Virol* **63**, 2893-900.

Lellouch-Tubiana, A., Fohlen, M., Robain, O. and Rozenberg, F. (2000). Immunocytochemical characterization of long-term persistent immune activation in human brain after herpes simplex encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 285-94.

Lerner, A. J. (1999). Women and Alzheimer's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1830-4.

Lin, W. R., Wozniak, M. A., Cooper, R. J., Wilcock, G. K. and Itzhaki, R. F. (2002). Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J Pathol* **197**, 395-402.

Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert, R., Helliwell, B., Hill, G. B. and McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* **156**, 445-53.

Linton, P. and Thoman, M. L. (2001). T cell senescence. *Front Biosci* **6**, D248-61.

Lipshutz, G. S., Gruber, C. A., Cao, Y., Hardy, J., Contag, C. H. and Gaensler, K. M. (2001). In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. *Mol Ther* **3**, 284-92.

Lopez, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* **258**, 152-3.

Luker, G. D., Bardill, J. P., Prior, J. L., Pica, C. M., Piwnica-Worms, D. and Leib, D. A. (2002). Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J Virol* **76**, 12149-61.

Luker, G. D. and Leib, D. A. (2005). Luciferase real-time bioluminescence imaging for the study of viral pathogenesis. *Methods Mol Biol* **292**, 285-96.

Lundberg, P., Welander, P. V., Edwards, C. K., 3rd, van Rooijen, N. and Cantin, E. (2007). Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol* **81**, 1451-60.

Lynas, C., Laycock, K. A., Cook, S. D., Hill, T. J., Blyth, W. A. and Maitland, N. J. (1989). Detection of herpes simplex virus type 1 gene expression in latently and productively infected mouse ganglia using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **70 (Pt 9)**, 2345-55.

Lynch, J. R., Tang, W., Wang, H., Vitek, M. P., Bennett, E. R., Sullivan, P. M., Warner, D. S. and Laskowitz, D. T. (2003). APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem* **278**, 48529-33.

Mahley, R. W. and Huang, Y. (1999). Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* **10**, 207-17.

Mahley, R. W. and Rall, S. C., Jr. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**, 507-37.

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H. and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5644-51.

Mandavilli, A. (2006). The amyloid code. *Nat Med* **12**, 747-51.

Mann, D. M., Tinkler, A. M. and Yates, P. O. (1983). Neurological disease and herpes simplex virus. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* **60**, 24-8.

Marcus, D. L., Strafaci, J. A. and Freedman, M. L. (2006). Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Med Sci Monit* **12**, BR8-14.

Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **23**, 134-47.

Markesbery, W. R., Kryscio, R. J., Lovell, M. A. and Morrow, J. D. (2005). Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* **58**, 730-5.

Markesbery, W. R. and Lovell, M. A. (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **19**, 33-6.

Marques, C. P., Cheeran, M. C., Palmquist, J. M., Hu, S. and Lokensgard, J. R. (2008). Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *J Neurovirol* **14**, 229-38.

Maue, A. C., Yager, E. J., Swain, S. L., Woodland, D. L., Blackman, M. A. and Haynes, L. (2009). T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol* **30**, 301-5.

May, P. C. and Finch, C. E. (1992). Sulfated glycoprotein 2: new relationships of this multifunctional protein to neurodegeneration. *Trends Neurosci* **15**, 391-6.

McDowell, I. (2001). Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging (Milano)* **13**, 143-62.

McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **22**, 799-809.

McGeer, P. L., Schulzer, M. and McGeer, E. G. (1996). Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* **47**, 425-32.

Meyer, H. M., Jr., Johnson, R. T., Crawford, I. P., Dascomb, H. E. and Rogers, N. G. (1960). Central nervous system syndromes of "vital" etiology. A study of 713 cases. *Am J Med* **29**, 334-47.

Milatovic, D., Zhang, Y., Olson, S. J., Montine, K. S., Roberts, L. J., 2nd, Morrow, J. D., Montine, T. J., Dermody, T. S. and Valyi-Nagy, T. (2002). Herpes simplex virus type 1 encephalitis is associated with elevated levels of F2-isoprostanes and F4-neuroprostanes. *J Neurovirol* **8**, 295-305.

Miller, C. S., Danaher, R. J. and Jacob, R. J. (1998). Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**, 541-62.

Montomerie, J. Z., Becroft, D. M., Croxson, M. C., Doak, P. B. and North, J. D. (1969). Herpes-simplex-virus infection after renal transplantation. *Lancet* **2**, 867-71.

Moreira, P. I., Santos, M. S., Oliveira, C. R., Shenk, J. C., Nunomura, A., Smith, M. A., Zhu, X. and Perry, G. (2008). Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 3-10.

Mori, I., Kimura, Y., Naiki, H., Matsubara, R., Takeuchi, T., Yokochi, T. and Nishiyama, Y. (2004). Reactivation of HSV-1 in the brain of patients with familial Alzheimer's disease. *J Med Virol* **73**, 605-11.

Mossman, K. L. (2002). Activation and inhibition of virus and interferon: the herpesvirus story. *Viral Immunol* **15**, 3-15.

Mossman, K. L. and Ashkar, A. A. (2005). Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol* **18**, 267-81.

Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **26**, 349-54.

Mucke, L. and Eddleston, M. (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *Faseb J* **7**, 1226-32.

Munoz, D. G. and Feldman, H. (2000). Causes of Alzheimer's disease. *Cmaj* **162**, 65-72.

Nachtigal, M. and Caulfield, J. B. (1984). Early and late pathologic changes in the adrenal glands of mice after infection with herpes simplex virus type 1. *Am J Pathol* **115**, 175-85.

Nakamura, T., Yanagihara, R., Gibbs, C. J., Jr., Amyx, H. L. and Gajdusek, D. C. (1985). Differential susceptibility and resistance of immunocompetent and immunodeficient mice to fatal Hantaan virus infection. *Arch Virol* **86**, 109-20.

Norton, A. J., Jordan, S. and Yeomans, P. (1994). Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* **173**, 371-9.

Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G. and Smith, M. A. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 631-41.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B. and Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-67.

Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S. and Smith, M. A. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **19**, 1959-64.

Nussbaum, R. L. and Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* **348**, 1356-64.

Oberg, J., Spenger, C., Wang, F. H., Andersson, A., Westman, E., Skoglund, P., Sunnemark, D., Norinder, U., Klason, T., Wahlund, L. O. and Lindberg, M. (2008). Age related changes in brain metabolites observed by 1H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* **29**, 1423-33.

Ott, B. R., Cohen, R. A., Gongvatana, A., Okonkwo, O. C., Johanson, C. E., Stopa, E. G., Donahue, J. E., Silverberg, G. D. and Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. Brain ventricular volume and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **20**, 647-57.

Paganini-Hill, A. and Henderson, V. W. (1994). Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* **140**, 256-61.

Paladino, P. and Mossman, K. L. (2009). Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 599-607.

Pawelec, G., Barnett, Y., Forsey, R., Frasca, D., Globerson, A., McLeod, J., Caruso, C., Franceschi, C., Fulop, T., Gupta, S., Mariani, E., Mocchegiani, E. and Solana, R. (2002). T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* **7**, d1056-183.

Pereira, D. B., Antoni, M. H., Danielson, A., Simon, T., Efantis-Potter, J., Carver, C. S., Duran, R. E., Ironson, G., Klimas, N., Fletcher, M. A. and O'Sullivan, M. J. (2003). Stress as a predictor of symptomatic genital herpes virus recurrence in women with human immunodeficiency virus. *J Psychosom Res* **54**, 237-44.

Perng, G. C., Dunkel, E. C., Geary, P. A., Slanina, S. M., Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn, A. B. and Wechsler, S. L. (1994). The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1

from latency. *J Virol* **68**, 8045-55.

Perry, V. H., Cunningham, C. and Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* **7**, 161-7.

Plackett, T. P., Boehmer, E. D., Faunce, D. E. and Kovacs, E. J. (2004). Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* **76**, 291-9.

Podlech, J., Weise, K. and Falke, D. (1990). Colonization of adrenal glands and ovaries of mice by HSV-2 variants. I. Virological studies. *Arch Virol* **110**, 165-77.

Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P. and Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**, 697-9.

Potratz, D., Brake, B., Dienes, H. P., Schulz, T. F., Hosp, M., Dierich, M. P. and Falke, D. (1986). Herpes simplex virus type 1 and 2 in the adrenal glands: replication and histopathology. *Arch Virol* **90**, 207-22.

Pratico, D., V. M. Y. L., Trojanowski, J. Q., Rokach, J. and Fitzgerald, G. A. (1998). Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *Faseb J* **12**, 1777-83.

Premkumar, D. R., Smith, M. A., Richey, P. L., Petersen, R. B., Castellani, R., Kutty, R. K., Wiggert, B., Perry, G. and Kalaria, R. N. (1995). Induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein in neocortex and cerebral vessels in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **65**, 1399-402.

Pyles, R. B. (2001). The association of herpes simplex virus and Alzheimer's disease: a potential synthesis of genetic and environmental factors. *Herpes* **8**, 64-8.

Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-44.

Raber, J., Wong, D., Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Pitas, R. E., Mahley, R. W. and Mucke, L. (1998). Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10914-9.

Rajavashisth, T. B., Kaptein, J. S., Reue, K. L. and Lusis, A. J. (1985). Evolution of apolipoprotein E: mouse sequence and evidence for an 11-nucleotide ancestral unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8085-9.

Ramirez Moreno, C. (2006). Implicación de la Apolipoproteína E en la infección hematógica y en la transmisión vertical del virus Herpes Simplex de tipo 1 en ratón. En *Departamento de Biología Molecular*: Universidad Autónoma de Madrid.

Rehemtulla, A., Stegman, L. D., Cardozo, S. J., Gupta, S., Hall, D. E., Contag, C. H. and Ross, B. D. (2000). Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* **2**, 491-5.

Robinson, S. R. and Bishop, G. M. (2002). Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **23**, 1051-72.

Robinson, S. R., Dobson, C. and Lyons, J. (2004). Challenges and directions for the pathogen hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 629-37.

Rodriguez, J. J., Olabarria, M., Chvatal, A. and Verkhratsky, A. (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* **16**, 378-85.

Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., Cao, P., Kolody, H., Veddars, L., Kolb, W. P. and Sabbagh, M. (2006). Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging* **27**, 1733-9.

Roizman, B. (1990). Herpesviridae. In *Fields Virology*, vol. 2 (ed. D. M. K. e. a. B.N. Fields), pp. 1787-1841. New-York: Raven-Press.

Roizman, B. (1996). Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In *Virology*, vol. 2 (ed. B. N. Fields), pp. 2231-2296. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Roizman, B. and Sears, A. E. (1987). An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol* **41**, 543-71.

Roizman, B. K. D. M. W., R J. (2007). Herpes Simplex Viruses. In *Filds Virology*, vol. two (ed. D. M. H. Knipe, P M), pp. 2501-2601: Lippincott Williams & Wilkins.

Rudkin, T. M. and Arnold, D. L. (1999). Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. *Arch Neurol* **56**, 919-26.

Sadler, A. J. and Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**, 559-68.

Sainz, B., Loutsch, J. M., Marquart, M. E. and Hill, J. M. (2001). Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med Hypotheses* **56**, 348-56.

Santana Martínez, S. (2010). Efectos de la infección con el virus Herpes Simplex tipo 1 en células neuronales y su relación con la enfermedad de Alzheimer. En *Departamento de Biología Molecular*: Universidad Autónoma de Madrid.

Satpute-Krishnan, P., DeGiorgis, J. A. and Bearer, E. L. (2003). Fast anterograde transport of herpes simplex virus: role for the amyloid precursor protein of alzheimer's disease. *Aging Cell* **2**, 305-18.

Sawtell, N. M., Poon, D. K., Tansky, C. S. and Thompson, R. L. (1998). The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol* **72**, 5343-50.

Sawtell, N. M. and Thompson, R. L. (1992). Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* **66**, 2150-6.

Sayre, L. M., Perry, G. and Smith, M. A. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* **21**, 172-88.

Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. and Zeillinger, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* **4**, 234-8.

Sedarati, F., Margolis, T. P. and Stevens, J. G. (1993). Latent infection can be established with drastically restricted transcription and replication of the HSV-1 genome. *Virology* **192**, 687-91.

Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487-98.

Sequiera, L. W., Jennings, L. C., Carrasco, L. H., Lord, M. A., Curry, A. and Sutton, R. N. (1979). Detection of herpes-simplex viral genome in brain tissue. *Lancet* **2**, 609-12.

Serrano Saiz, E. (2007). Efecto de la proteína presentadora de antígenos tap en la infección *in vivo* del virus Herpes Simplex tipo 1 y generación de modelos transgénicos para su estudio. *Departamento de Biología Molecular*: Universidad Autónoma de Madrid.

Shen, W., Sa e Silva, M., Jaber, T., Vitvitskaia, O., Li, S., Henderson, G. and Jones, C. (2009). Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol* **83**, 9131-9.

Shimeld, C., Whiteland, J. L., Williams, N. A., Easty, D. L. and Hill, T. J. (1997). Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78** (Pt 12), 3317-25.

Simmons, A. (1989). H-2-linked genes influence the severity of herpes simplex virus infection of the peripheral nervous system. *J Exp Med* **169**, 1503-7.

Smiley, J. R. (2004). Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J Virol* **78**, 1063-8.

Smith, J. S. and Robinson, N. J. (2002). Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S3-28.

Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. and Kowall, N. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* **382**, 120-1.

Smith, M. A., Sayre, L. M., Monnier, V. M. and Perry, G. (1995). Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **18**, 172-6.

Sprague, E. R., Martin, W. L. and Bjorkman, P. J. (2004). pH dependence and stoichiometry of binding to the Fc region of IgG by the herpes simplex virus Fc receptor gE-gI. *J Biol Chem* **279**, 14184-93.

Stanberry, L. R. (1989). Animal model of ultraviolet-radiation-induced recurrent herpes simplex virus infection. *J Med Virol* **28**, 125-8.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64.

Steiner, I., Spivack, J. G., Lirette, R. P., Brown, S. M., MacLean, A. R., Subak-Sharpe, J. H. and Fraser, N. W. (1989). Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection. *Embo J* **8**, 505-11.

Stevens, J. G. and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-5.

Stevens, J. G., Wagner, E. K., Devi-Rao, G. B., Cook, M. L. and Feldman, L. T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**, 1056-9.

Strandberg, T. E. and Tilvis, R. S. (2000). C-reactive protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1057-60.

Strittmatter, W. J. and Roses, A. D. (1995). Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4725-7.

Su, B., Wang, X., Nunomura, A., Moreira, P. I., Lee, H. G., Perry, G., Smith, M. A. and Zhu, X. (2008). Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 525-32.

Summers, B. C. and Leib, D. A. (2002). Herpes simplex virus type 1 origins of DNA replication play no role in the regulation of flanking promoters. *J Virol* **76**, 7020-9.

Symms, M., Jager, H. R., Schmierer, K. and Yousry, T. A. (2004). A review of structural magnetic resonance neuroimaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**, 1235-44.

Tanaka, S., Minagawa, H., Toh, Y., Liu, Y. and Mori, R. (1994). Analysis by RNA-PCR of latency and reactivation of herpes simplex virus in multiple neuronal tissues. *J Gen Virol* **75** (Pt 10), 2691-8.

Tang, M. X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H. and Mayeux, R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* **348**, 429-32.

Tesseur, I., Van Dorpe, J., Spittaels, K., Van den Haute, C., Moechars, D. and Van Leuven, F. (2000). Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* **156**, 951-64.

Theil, D., Derfuss, T., Paripovic, I., Herberger, S., Meinl, E., Schueler, O., Strupp, M., Arbusow, V. and Brandt, T. (2003). Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* **163**, 2179-84.

Thompson, J. F., Hayes, L. S. and Lloyd, D. B. (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* **103**, 171-7.

Turner, R. S. (2001). Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk. *Am J Pathol* **158**, 797-801.

Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M. and Cullen, B. R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**, 780-3.

Valyi-Nagy, T. and Dermody, T. S. (2005). Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol* **20**, 957-67.

Valyi-Nagy, T., Olson, S. J., Valyi-Nagy, K., Montine, T. J. and Dermody, T. S. (2000). Herpes simplex virus type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons. *Virology* **278**, 309-21.

Vlad, S. C., Miller, D. R., Kowall, N. W. and Felson, D. T. (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* **70**, 1672-7.

Vollstedt, S., Arnold, S., Schwerdel, C., Franchini, M., Alber, G., Di Santo, J. P., Ackermann, M. and Suter, M. (2004). Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J Virol* **78**, 3846-50.

Vollstedt, S., Franchini, M., Hefti, H. P., Odermatt, B., O'Keeffe, M., Alber, G., Glanzmann, B., Riesen, M., Ackermann, M. and Suter, M. (2003). Flt3 ligand-treated neonatal mice have increased innate immunity against intracellular pathogens and efficiently control virus infections. *J Exp Med* **197**, 575-84.

Wagner, E. K., Guzowski, J. F. and Singh, J. (1995). Transcription of the herpes simplex virus genome during productive and latent infection. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **51**, 123-65.

Warren, K. G., Brown, S. M., Wroblewska, Z., Gilden, D., Koprowski, H. and Subak-Sharpe, J. (1978). Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. *N Engl J Med* **298**, 1068-9.

Weisgraber, K. H. (1994). Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* **45**, 249-302.

Weiskopf, D., Weinberger, B. and Grubeck-Loebenstien, B. (2009). The aging of the immune system. *Transpl Int* **22**, 1041-50.

Whitley, R. J. and Gnann, J. W. (2002). Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* **359**, 507-13.

Whitley, R. J. and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513-8.

Wiegand, H., Dienes, H. P., Schirmacher, P., Podlech, J., Bohl, K., Bohle, M., Neumann-Haefelin, D. and Falke, D. (1991). Colonization of adrenal glands and ovaries of mice by variants of HSV 1 and 2. II. Histopathological, immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Arch Virol* **117**, 237-49.

Wootton, R. and Flecknell, P. A. (1987). Record-keeping requirements of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and how to meet them. *Lab Anim* **21**, 267-75.

Wozniak, M. A., Frost, A. L. and Itzhaki, R. F. (2009a). Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis* **16**, 341-50.

Wozniak, M. A., Itzhaki, R. F., Shipley, S. J. and Dobson, C. B. (2007). Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett* **429**, 95-100.

Wozniak, M. A., Mee, A. P. and Itzhaki, R. F. (2009b). Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* **217**, 131-8.

Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K. and Itzhaki, R. F. (2005). Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J Med Virol* **75**, 300-6.

Wu, J. C., Sundaresan, G., Iyer, M. and Gambhir, S. S. (2001). Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* **4**, 297-306.

Wyss-Coray, T. and Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* **35**, 419-32.

Xu, F., Schillinger, J. A., Sternberg, M. R., Johnson, R. E., Lee, F. K., Nahmias, A. J. and Markowitz, L. E. (2002). Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988-1994. *J Infect Dis* **185**, 1019-24.

Yankner, B. A., Lu, T. and Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annu Rev Pathol* **3**, 41-66.

Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H. and Mahley, R. W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18700-5.

Yirrell, D. L., Blyth, W. A. and Hill, T. J. (1987). The influence of androgens on paralysis in mice following intravenous inoculation of herpes simplex virus. *J Gen Virol* **68** (Pt 9), 2461-4.

York, I. A., Roop, C., Andrews, D. W., Riddell, S. R., Graham, F. L. and Johnson, D. C. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* **77**, 525-35.

Zhu, X., Lee, H. G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G. and Smith, M. A. (2005). Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **31**, 205-17.

Zivadinov, R. (2007). Can imaging techniques measure neuroprotection and remyelination in multiple sclerosis? *Neurology* **68**, S72-82; discussion S91-6.

ANEXO: Publicaciones
